



Naturalis

Repositorio Institucional

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Caracterización de la estructura genética y análisis filogeográfico de poblaciones de *Calophyllum brasiliense* Cambess. [Calophyllaceae]

Percuoco, Cecilia Beatriz

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Argüelles, Carina F.

Co-dirección: Crisci, Jorge V.

Facultad de Ciencias Naturales y Museo

2014

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20140603001351>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



Naturalis

Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP



Facultad de Ciencias
Naturales y Museo

Universidad Nacional de La Plata

TESIS DOCTORAL



***CARACTERIZACIÓN GENÉTICA y ANÁLISIS
FILOGEOGRÁFICO DE POBLACIONES DE
Calophyllum brasiliense CAMB.
(CALOPHYLLACEAE)***

Cecilia B. Percuoco

Directora:

Dra. Carina F. Argüelles

Co-director:

Dr. Jorge V. Crisci

2014



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES y MUSEO
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

TESIS DOCTORAL

**“Caracterización de la estructura genética y análisis filogeográfico
de poblaciones de *Calophyllum brasiliense* Cambess.
(*Calophyllaceae*)”**

Autora: Cecilia Beatriz Percuoco

Directora: Dra. Carina F. Argüelles

Co-Director: Dr. Jorge V. Crisci

2014

El siguiente trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Naturales de la FCNyM (UNLP) ha sido realizado en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones, ciudad de Posadas; bajo la dirección de la Dra. Carina Argüelles y la co-Dirección del Dr. Jorge Crisci.

*A mi hijo Ezequiel, que nos hace
felices cada día y a mi esposo
Federico por estar siempre conmigo*

Reconocimientos

A la FCNyM por permitirme realizar y concluir la carrera del Doctorado.

A la FCEQyN (UNaM), y en especial al Laboratorio GIGA (IBS-UNaM-CONICET) y sus investigadores, por el esfuerzo puesto en la creación y el funcionamiento de este nuevo espacio de trabajo.

A CONICET, por la oportunidad de dedicarme a la investigación.

Agradecimientos

A la Dra. Carina Argüelles, por el acompañamiento constante desde el comienzo y en todas las etapas de la realización de este trabajo. Gracias por el apoyo y la energía puesta en el proyecto de “arary”, fundamentales para alcanzar los logros y satisfacciones que nos ha dado, en lo grupal y en lo personal. Por la gestión del espacio y de los recursos, humanos y económicos. Por el cariño y la tolerancia, indispensables para conservar y fortalecer el vínculo que construimos a lo largo de estos años.

Al Dr. Jorge Crisci, por la confianza brindada al aceptar formar parte de este trabajo, por el acompañamiento y la presencia durante este tiempo. Gracias especialmente por representarme en la FCNyM, acortando tantas veces la distancia.

A la Lic. Manuela Rodríguez, por las contribuciones desde la botánica y la fitogeografía. Por el compromiso y el entusiasmo puesto en nuestro trabajo.

A la Dra. Mónica Balzarini y su equipo de investigación por la confianza depositada al sumarse a este proyecto y por la orientación brindada en el comienzo del análisis de los datos.

Al proyecto PICTO UNaM 2011 N°122 por el financiamiento de parte de los insumos de laboratorio e instancias de formación requeridos por el presente trabajo.

A los responsables de: Reserva Privada Jorge Esteban Velázquez de San Ignacio (Mnes), Refugio Rincón Ombú (Ctes), empresa forestal Pomera (Ctes); Dirección de Parques y Reservas de la provincia de Ctes. y Ministerio de Ecología de Misiones por permitir el acceso y la obtención de material biológico en los sitios de muestreo.

A todo el grupo “arary”, por la ayuda y colaboración en cada salida de campo.

Al geólogo Fernando Crivello, por sus aportes en la interpretación de los resultados obtenidos y la revisión de las secciones referidas a la geomorfología regional.

Al Lic. Leonardo Amarilla por la colaboración en la colección y el transporte de las muestras de “arary” desde México.

Al Dr. Cristian Rojas por los cebadores cedidos para la realización de parte de este trabajo.

Al Dr. Diego Gutiérrez, por la disposición y el compromiso puesto en ayudarme desde lo académico en la última etapa de la Carrera del Doctorado.

A la Prof. Analía Fortte por su colaboración desinteresada y comprometida en la revisión de ambos resúmenes.

Entre muchas lindas personas que me ha dejado esta etapa, agradezco especialmente a: Liliana Talavera y Lucas Giménez, por compartir conmigo el trabajo y la amistad. A Cecilia Castro, Ariel Beltramino y Roberto Vogler, gracias por el ánimo y la confianza, por representarme más de una vez en la FCNyM y por recibirme en La Plata con tanta buena onda.

A los compañeros de laboratorio, pasados y actuales, por hacer que siempre me haya sentido cómoda y a gusto en nuestro espacio. En especial a Gustavo Bich por su ayuda en el trabajo de laboratorio.

A mis padres, Susana y Yuyo, y a mis hermanos Germán y Matías, que siempre me han apoyado y me acompañan incondicionalmente sea cual sea mi proyecto, GRACIAS!!

A mis dos grandes amores, mi hijo Ezequiel, que me regala la risa, el juego y la simpleza por más complicados que sean los días, y a mi esposo Federico, por apoyarme y acompañarme en todo momento. Infinitas gracias por compartir la vida y por todo.

Finalmente debo agradecer a los jurados, Dra. Gisela Sancho, Dra. María Virginia Sánchez Puerta y Dra. Mariana Grossi, por los valiosos comentarios realizados, los que contribuyeron a mejorar el presente manuscrito.

Índice general

Índice general	v
Índice de Figuras	viii
Índice de Tablas	x
Abreviaturas	xii
Resumen	xv
Abstract	xvi
I. Introducción	1
I.1 Las Selvas de América del Sur: su conformación y estado actual	1
I.2 Aspectos geomorfológicos de la región mesopotámica.....	4
I.3 Estado de conservación de las formaciones selváticas de América del Sur	6
I.4 Las selvas ribereñas de la Provincia del Bosque Paranaense	7
I.5 <i>Calophyllum brasiliense</i> , especie característica de selvas higrófilas.....	9
I.5.1 Las nuevas citas de <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess. en Argentina y Paraguay	15
I.5.2 Situación de las poblaciones más australes de <i>Calophyllum brasiliense</i>	16
I.6 La caracterización genética como herramienta para la conservación de las poblaciones	18
I.7 La estructuración de la diversidad genética en las poblaciones naturales	20
I.8 El análisis filogeográfico: factores históricos y distribución geográfica de linajes	21
I.9 Marcadores moleculares en la evaluación de la variación genética de las poblaciones naturales.....	22
I.9.1 Regiones de ADN polimórficas reveladas mediante cebadores de secuencia arbitraria (RAPDs)	24
I.9.2 Regiones de ADN polimórficas reveladas mediante cebadores anclados en regiones microsatélites (ISSRs)	26
I.9.3 Marcadores hipervariables en el genoma de plantas: los microsatélites o SSRs	26
I.9.3.1 El origen del polimorfismo en regiones microsatélites	28
I.10 El genoma cloroplástico: la molécula de elección en estudios filogeográficos de plantas.....	29
I.10.1 Marcadores genéticos en el genoma plastidial	33
I.10.1.1 Regiones cloroplásticas informativas	33
I.10.1.2 Polimorfismos de longitud en el genoma cloroplástico.....	34
II. Hipótesis y Objetivos	38
II.1 Hipótesis	38
II.2 Objetivos.....	38
II.2.1 Objetivo general	38
II.2.2 Objetivos específicos.....	38
III. Materiales y Métodos	40
III.1 Sitio de Estudio.....	40
III.2 Material biológico.....	43
III.3 Extracción de ADN a partir de tejido foliar.....	44
III.3.1 Criterios de pureza, integridad y semicuantificación del ADN extraído	45
III.4 Obtención de marcadores moleculares nucleares y citoplasmáticos	49

III.4.1	Marcadores genéticos dominantes en el genoma nuclear de <i>C. brasiliense</i>	49
III.4.1.1	Amplificación al azar de polimorfismos de ADN nuclear: RAPDs (<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>).....	49
III.4.1.2	Amplificación al azar de polimorfismos de ADN nuclear: ISSRs (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>).....	52
III.4.1.3	Análisis de perfiles RAPDs e ISSRs en el genoma nuclear de <i>C. brasiliense</i>	55
III.4.2	Marcadores genéticos codominantes en el genoma nuclear de <i>C. brasiliense</i>	65
III.4.3	Análisis de regiones informativas en el genoma cloroplástico de <i>C. brasiliense</i>	68
III.4.3.1	Amplificación de microsatélites cloroplásticos o cpSSRs.....	68
III.4.3.1.1	Diseño de <i>primers</i> internos para el Intrón del gen <i>trnL</i> en el ADNcp de <i>C. brasiliense</i>	68
III.4.3.2	Amplificación de regiones cloroplásticas intergénicas en <i>C. brasiliense</i>	70
III.4.3.3	Secuenciación de amplicones cloroplásticos	73
III.4.3.4	Obtención de perfiles de restricción en ADN cloroplástico (ADNcp-RFLPs).....	74
III.4.3.4.1	Selección de endonucleasas de restricción (ER).....	74
III.4.3.4.2	Digestión enzimática de los productos amplificados.....	75
III.4.3.4.3	Análisis de los perfiles cloroplásticos obtenidos por digestión con <i>MboI</i>	75
III.4.3.5	Análisis de las secuencias cloroplásticas obtenidas.....	76
III.4.3.6	Esquemización del genoma de <i>C. brasiliense</i>	79
IV.	Resultados	81
IV.1	Regiones informativas en el genoma nuclear de <i>C. brasiliense</i>	81
IV.1.1	Obtención de perfiles RAPDs en las poblaciones de San Ignacio y Rincón Ombú	81
IV.1.2	Obtención de perfiles ISSRs en las poblaciones de San Ignacio y Rincón Ombú	81
IV.1.3	Variabilidad Genética estimada a partir de perfiles RAPDs.....	86
IV.1.3.1	Estimación de frecuencias alélicas y análisis poblacional.....	86
IV.1.3.2	Distribución de la variabilidad genética en las poblaciones de <i>C. brasiliense</i> provenientes de San Ignacio y Rincón Ombú.....	92
IV.1.3.2.1	Análisis molecular de la variancia (AMOVA)	92
IV.1.3.2.2	Análisis de Componentes Principales (PCoA)	93
IV.1.3.2.3	Test de Mantel	95
IV.1.3.2.4	Análisis de la estructuración genética espacial a escala local de las poblaciones de <i>C. brasiliense</i> estudiadas	98
IV.1.4	Amplificación de <i>loci</i> SSRs nucleares en poblaciones argentinas de <i>C. brasiliense</i>	100
IV.2	Regiones informativas en el genoma cloroplástico de <i>C. brasiliense</i>	102
IV.2.1	Amplificación de regiones microsatélites cloroplásticas.....	102
IV.2.2	Amplificación de regiones intergénicas de ADNcp	102
IV.2.3	Secuenciación y edición de las regiones cloroplásticas amplificadas	106
IV.2.4	Análisis de secuencias cloroplásticas obtenidas en las diferentes poblaciones de <i>C. brasiliense</i> analizadas	109
IV.2.4.1	Caracterización de secuencias cloroplásticas que exhiben microsatélites	109
IV.2.4.2	Obtención de perfiles de restricción en ADN cloroplástico (ADNcp-RFLPs).....	111
IV.2.4.2.1	Selección de endonucleasas de restricción: Análisis <i>in silico</i>	111
IV.2.4.2.2	Análisis de los perfiles ADNcp-RFLPs.....	112
IV.2.4.3	Edición y caracterización de secuencias intergénicas obtenidas en <i>C. brasiliense</i>	114
IV.2.4.4	Análisis filogeográfico de las poblaciones de <i>C. brasiliense</i> estudiadas.....	121

IV.2.4.5	Esquematización de las regiones de ADNcp de <i>C. brasiliense</i> analizado en el presente trabajo.....	126
V.	Discusión.....	130
V.1	Caracterización genética de poblaciones argentinas de <i>C. brasiliense</i> mediante marcadores nucleares.....	130
V.2	Evaluación de regiones cloroplásticas en las poblaciones de <i>C. brasiliense</i> analizadas	144
V.3	Consideraciones sobre el origen de las poblaciones australes de <i>C. brasiliense</i>	152
V.4	Implicancias de los resultados obtenidos para la conservación de las poblaciones de <i>C. brasiliense</i>	157
VI.	Conclusiones.....	162
VII.	Bibliografía.....	165
VIII.	Anexos.....	182
VIII.1	Anexo I	182
VIII.2	Anexo II.....	183
VIII.3	Anexo III	188
VIII.4	Anexo IV	195

Índice de Figuras

Figura 1.	Subregiones y Provincias Biogeográficas de América del Sur.	3
Figura 2.	Distribución geográfica de <i>C. brasiliense</i>	11
Figura 3.	<i>Calophyllum brasiliense</i>	14
Figura 4.	Representación esquemática del genoma cloroplástico típico	32
Figura 5.	Localización de las poblaciones de <i>C. brasiliense</i> estudiadas	42
Figura 6.	Trabajo en las parcelas	46
Figura 7.	Verificación de extracción de ADN genómico total	48
Figura 8.	Perfiles RAPDs obtenidos en la población de <i>C. brasiliense</i> de San Ignacio.	82
Figura 9.	Perfiles RAPDs obtenidos en la población de <i>C. brasiliense</i> de San Ignacio.	83
Figura 10.	Perfiles RAPDs obtenidos en la población de <i>C. brasiliense</i> de Rincón Ombú.....	84
Figura 11.	Ejemplos de perfiles obtenidos durante la optimización de los ISSRs	85
Figura 12.	Distribución de las frecuencias génicas.....	91
Figura 13.	AMOVA.....	92
Figura 14.	Análisis de Componentes Principales de la variabilidad genética total	93
Figura 15.	Análisis de Componentes Principales de la variabilidad genética	94
Figura 16.	Test de Mantel.....	96
Figura 17.	Distribución de frecuencias del Coeficiente de Correlación obtenido	97
Figura 18.	Correlogramas entre distancia genética y espacial calculados	99
Figura 19.	Amplificación del SSR nuclear clm1	100
Figura 20.	Electroferogramas de amplicones obtenidos con el microsatélite nuclear clm1.....	101
Figura 21.	Amplificaciones de SSRs cloroplásticos.....	103
Figura 22.	Regiones cloroplásticas intergénicas amplificadas.	104
Figura 23.	Fragmentos de diferentes electroferogramas que muestran las distintas calidades de secuencias obtenidas	107
Figura 24.	Motivos de repetición de <i>C. brasiliense</i> en las secuencias analizadas.	111
Figura 25.	Ejemplos de las amplificaciones del intrón del gen <i>trnL</i>	111
Figura 26.	Sitios de restricción de la ER <i>MboI</i> en la región <i>psbC-trnS</i>	113
Figura 27.	Digestión enzimática de la región <i>psbC-trnS</i> con la endonucleasa de restricción <i>MboI</i>	114
Figura 28.	Electroferogramas de la región <i>trnH-psbA</i>	115
Figura 29.	Coamplificación de <i>rpl32-trnL</i> con <i>Tomato Severe Rugose Virus</i>	116
Figura 30.	Representación de la estructura tallo-bucle de la región <i>petG-trnP</i>	120
Figura 31.	Árbol filogenético de los haplotipos hallados	125
Figura 32.	Red de haplotipos obtenida a partir de la secuencias del intrón del gen <i>trnL</i>	126
Figura 33.	Representación gráfica de las secuencias del ADNcp de <i>C. brasiliense</i>	128

Figura 34.	Situación de las poblaciones argentinas de <i>C. brasiliense</i>	139
Figura 35.	Trazo individual del hemíptero <i>Rhinacloa</i>	156

Índice de Tablas

Tabla I.	Localización geográfica y números de individuos colectados en las poblaciones.....	41
Tabla II.	Detalle de la secuencia de <i>primers</i> utilizados para la obtención de perfiles RAPDs.....	51
Tabla III.	Composición de la mezcla de reacción de PCR.	51
Tabla IV.	Perfil de ciclado para la obtención de RAPDs.	52
Tabla V.	Detalle de la secuencia de <i>primers</i> ISSRs utilizados.	53
Tabla VI.	Composición de la mezcla de reacción para la amplificación de ISSRs.	54
Tabla VII.	Perfil de amplificación 1 para la obtención de marcadores ISSRs.....	54
Tabla VIII.	Perfil de amplificación 2 para la obtención de marcadores ISSRs.....	55
Tabla IX.	Detalle de las secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación de los <i>loci</i> microsatélites nucleares.....	66
Tabla X.	Detalle de las condiciones de ciclado para SSR nucleares.....	67
Tabla XI.	Composición de la mezcla de reacción de PCR para SSRs nucleares.	67
Tabla XII.	Detalle de las secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación de los <i>loci</i> microsatélites cloroplásticos.....	69
Tabla XIII.	Detalle de las condiciones de ciclado de los cpSSRs.....	69
Tabla XIV.	Detalle de las secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación de las regiones intergénicas seleccionadas.....	71
Tabla XV.	Composición de las mezclas de reacción optimizadas para las regiones intergénicas	72
Tabla XVI.	Detalles de los perfiles de ciclado optimizados para cada región intergénica.....	73
Tabla XVII.	Mezcla de reacción para la ER <i>MboI</i>	75
Tabla XVIII.	Información referida a los marcadores obtenidos para los <i>primers</i> seleccionados.....	86
Tabla XIX.	Porcentaje de <i>loci</i> Polimórficos.....	87
Tabla XX.	Parámetros poblacionales estimados, discriminados por población y por <i>locus</i>	88
Tabla XXI.	Media y error estándar (ES) de los parámetros estimados	90
Tabla XXII.	AMOVA en las poblaciones de San Ignacio y Rincón Ombú.	92
Tabla XXIII.	Análisis de Componentes Principales.	93
Tabla XXIV.	Test de Mantel.....	95
Tabla XXV.	Autocorrelación espacial en SI.....	98
Tabla XXVI.	Tamaño estimado de las regiones intergénicas amplificadas.	103
Tabla XXVII.	BLAST de las secuencias obtenidas con la base de datos GenBank.....	108
Tabla XXVIII.	Detalle de la longitud de las secuencias cloroplásticas obtenidas	109
Tabla XXIX.	Descripción de los cpSSRs encontrados en las regiones cloroplásticas.....	110
Tabla XXX.	Características de la ER <i>MboI</i>	112

Tabla XXXI.	Resultados del alineamiento de la banda espúrea de la región <i>rpl32-trnL</i>	117
Tabla XXXII.	Haplotipos identificados a partir del alineamiento de la región <i>rpl32-trnL</i>	118
Tabla XXXIII.	Haplotipos identificados a partir del alineamiento de la región <i>psbJ-petA</i>	119
Tabla XXXIV.	Haplotipos identificados a partir del alineamiento de la región <i>petG-trnP</i>	120
Tabla XXXV.	Números de acceso (#) de las secuencias intergénicas descritas para <i>C brasiliense</i> en el presente trabajo.....	121
Tabla XXXVI.	Análisis de sitios polimórficos en el intrón del gen <i>trnL</i> de <i>C. brasiliense</i>	122
Tabla XXXVII.	Parámetros de diversidad estimados.....	123
Tabla XXXVIII.	Haplotipos identificados a partir del alineamiento del intrón del gen <i>trnL</i>	123
Tabla XXXIX.	Índices F_{ST} de diferenciación poblacional.	124
Tabla XL.	Test de neutralidad efectuados a partir de las secuencias del intrón del gen <i>trnL</i>	124

Abreviaturas

A: base púrica **Adenina**

ADN: **Ácido DesoxirriboNucléico**

ADNcp: ADN cloroplástico

ADNmt: ADN mitocondrial

ADNn: ADN nuclear

AFLPs: *Amplified Fragment Length Polymorphisms*

AMOVA: **Análisis Molecular de la Variancia**

ARG: Argentina

B: base nucleotídica C, G o T

BLAST: **Basic Local Alignment Search Tool**

BR: Brasil

BrEt: Bromuro de Etidio

BSA: Albúmina Sérica Bovina (inglés: *Bovine Seric Albumin*)

C: base pirimidínica Citosina

cpSSRs: *Chloroplast Simple Sequence Repeats*

c.s.p.: cantidad suficiente para

CTAB: Bromuro de Hexadecyl-trimetil-amonio (inglés: *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*)

D: base nucleotídica A, C o T

D: Distancia genética

DIECA: Dietilditiocarbonato

dNTPs: **DesoxirriboNucleótidos Trifosfato**

EDTA: **Ácido EtilenDiaminoTetrAcético**

e.g.: por ejemplo (latín: *Exempli Gratia*)

ER: Enzima de **R**estricción

et al.: y otros

etc.: etcétera

Φ_{PT} : Índice de diferenciación poblacional *Phi*

F_{ST} : Índice de diferenciación poblacional

G: base púrica **Guanina**

H1,H2,H3: Haplotipo 1,2,3

H_0 : Hipótesis Nula

H_A : Hipótesis Alternativa

HCl: ácido clorhídrico

H_d : Diversidad haplotípica

H_e : Heterocigocidad esperada

I : Índice de diversidad de Shannon

IAM: *Infinite Alele Model*

IR: Repeticiones Invertidas del ADNcp (*Inverted Repeats*)

ISSR: *Inter Simple Sequence Repeats*

Kb: kilobase

λ : lambda

LSC: Copia única mayor del ADNcp (**L**arge **S**ingle **C**opy)

MC: Media de Cuadrados

MG-BR: Minas Gerais-Brasil

MgCl₂: Cloruro de magnesio

MboI: *Moraxella bovis I* (ER)

MX: México

mers: sufijo precedido por un número para indicar la longitud de un oligonucleótido

N: cualquier base nucleotídica

N: Tamaño muestral	RAPD: <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
n°: Número	RFLPs: <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
n_a: Número de alelos	RO: Rincón Ombú
NaCl: Cloruro de sodio	rpl32: gen ribosomal de union a la subunidad ribosomal mayor (<i>ribosomal protein large 32</i>)
n_e: Número efectivo de alelos	R_{ST}: Índice de diferenciación poblacional
p: frecuencia génica del alelo <i>p</i>	R_{xy}: coeficiente de correlación
P: Porcentaje de <i>loci</i> polimórficos	S: número de sitios Segregantes
pb: pares de bases	S: desvío estándar
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (inglés: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)	SC: Suma de Cuadrados
PCoA: Análisis de Componentes Principales	SI: San Ignacio
pH: potencial de iones hidronio	S: <i>Stepwise Mutation Model</i>
π: Diversidad nucleotídica	sp.: especie
psbA: <i>photosystem bA</i> (gen A del fotosistema II en el ADNcp)	SSC: Copia única menor del ADNcp (Small Single Copy)
psbC: <i>photosystem b A</i> (gen C del fotosistema II en el ADNcp)	SSRs: <i>Simple Sequence Repeats</i>
petA: gen A del complejo del citocromo en el ADNcp	STRs: <i>Simple Tandem Repeats</i>
petG: gen G del complejo del citocromo en el ADNcp	T: Temperatura
psbJ: <i>photosystem b J</i> (gen J del fotosistema II en el ADNcp)	TBE: Tris Borato EDTA
POP: Población	Tm: temperatura de fusión (inglés: <i>melting temperatura</i>).
PV: Puerto Valle	trnG: gen del ARN de transferencia del aminoácido Glicina en el ADNcp
PVP: Polivinilpirrolidona	trnH: gen del ARN de transferencia del aminoácido Histidina en el ADNcp
PY: Paraguay	trnL: gen de ARN de transferencia del aminoácido Leucina en el ADNcp
q: frecuencia génica del alelo <i>q</i>	trnS: gen de ARN de transferencia del aminoácido Serina en el ADNcp
R: base nucleotídica A o G	
r: coeficiente de autocorrelación	

trnP: gen de ARN de transferencia del aminoácido Prolina en el ADNcp

U: Unidad

UBC: University of British Columbia

UP: Ultrapura

UV: ultravioleta

Y: base nucleotídica C o T

Unidades

cm: centímetro

μl: microlitro

μg: microgramo

μM: micromolar

g: gramo

g: unidad de aceleración de la gravedad

h: hora

M: Molar

ml: mililitro

mm: milímetro

ng: nanogramo

mg: miligramo

mM: milimolar

P/V: Peso/Volumen

s: segundo

V: Voltio

V/cm:

°C: Grado Celsius

RESUMEN

El interés por la conservación de las comunidades ribereñas del río Paraná ha llevado a la identificación de nuevas especies para la flora argentina durante los últimos años. En el noreste de Argentina y sureste de Paraguay, se han identificado poblaciones de *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Calophyllaceae) en remanentes de selvas higrófilas, especie arbórea típica de selvas inundables y tolerante a la inundación. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la variabilidad genética de seis poblaciones, tres argentinas, dos paraguayas y una mexicana, a través de marcadores moleculares y establecer relaciones filogeográficas entre ellas, con el fin último de contribuir en la planificación de estrategias de conservación. Se obtuvieron 56 *loci* RAPDs a partir de los cuales se estimaron parámetros genéticos clásicos para dos de las poblaciones. La heterocigosidad esperada total fue baja ($He=0,273$), al igual que el índice de diversidad de Shannon ($I=0,406$). La diferenciación interpoblacional fue muy elevada ($\phi_{ST}=0,283$), encontrándose el 78% de la variabilidad genética dentro de las poblaciones. Quedó demostrado además que la población de San Ignacio presenta estructuración genética espacial dentro de los 20 m de distancia, información relevante en el diseño de estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*. Por otro lado, se describieron las secuencias de siete regiones intergénicas y una intrónica del genoma cloroplástico, en suma 1.749 pb, cuatro de las cuales mostraron diferencias nucleotídicas. No obstante, se escogió el intrón del gen *trnL* para realizar el análisis filogeográfico de las seis poblaciones, que permitieron estimar la diversidad nucleotídica ($\pi=0,00237$) y haplotípica ($Hd=0,296$). Se identificaron tres haplotipos que discriminaron las poblaciones argentinas, paraguayas y mexicana. Las variantes haplotípicas encontradas en el presente trabajo nos llevaron a reconsiderar y plantear un modelo de las rutas de dispersión geográfica y colonización de *C. brasiliense* en el pasado, a través del río Paraná como de vías alternativas.

ABSTRACT

In recent years the growing interest in Paraná River's riparian forest conservation led to the discovery of new plant species in Argentina. In the hygrophile forest remnants from Northeastern part of Argentina and Southeastern area of Paraguay, populations of *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Calophyllaceae), a typical flood lowlands species, were identified. The aims of this work were to characterize and compare the genetic variability within and among six populations of *C. brasiliense*, three from Argentina, two from Paraguay and one from Mexico, using molecular markers and to infer phylogeographic relationships among populations, in order to contribute with the planning of conservation strategies. Classic genetic population parameters were estimated once 56 RAPDs *loci* were obtained. The total expected heterozygosity ($He=0,273$) and the Shannon diversity index ($I=0,406$) obtained were low. On the other hand, interpopulation differentiation was high ($\phi_{ST}=0,283$), and 78% of genetic variability observed was within populations. At the same time the spatial genetic analysis demonstrated that the population from San Ignacio is genetically structured at distances shorter than 20 m, being this data relevant for the design of *in situ* and *ex situ* conservation projects. Besides, seven intergenic and one intronic chloroplast genome regions were described, adding up a total of 1.749 pb. Four of these regions showed nucleotide differences. However, only the *trnL* intron was selected for the phylogeographic analysis, being possible to estimate the nucleotide ($\pi=0,00237$) and haplotypic diversity ($Hd=0,296$). Finally, three haplotypes were identified through which Argentinean, Paraguayan and Mexican populations could be differentiated. The haplotypic variants that have been found in the present work led us to reconsider and propose a model on *C. brasiliense*' geographic dispersion and colonization used in the past, both through the Paraná River and alternative routes.



I. Introducción

I.1 Las Selvas de América del Sur: su conformación y estado actual

Las tierras bajas tropicales de América de Sur presentan una notable riqueza florística y faunística, lo que ha motivado la proposición de distintas teorías que expliquen la alta biodiversidad. Las más reconocidas analizan la respuesta de las selvas a las transiciones entre períodos glaciales e interglaciales que tuvieron lugar durante el Cuaternario en las zonas continentales tropicales, las que habrían ocasionado cambios drásticos en los patrones de vegetación a causa de las variaciones paleoclimáticas ocurridas. Estas modificaciones en las formaciones vegetales han sido principalmente evidenciadas por estudios geomorfológicos y palinológicos (Adams *et al.*, 1990; Servant *et al.*, 1993). Las dunas originadas por la acción de corrientes de aire y las barrancas resultantes de procesos de erosión, características del Cuaternario tardío, se encuentran hoy, en Sudamérica, cubiertas por selvas tropicales, indicando que la vegetación experimentó un marcado retroceso durante el pasado, para expandirse nuevamente hasta fijar estos accidentes geográficos. A esta evidencia, se suman las distribuciones geográficas heterogéneas de los distintos taxones y la gran diversidad específica de los ecosistemas de las selvas tropicales, interpretadas como consecuencia de la existencia de periodos secos en el pasado que han fragmentado las selvas, aislando estas comunidades biológicas en áreas restrictas, conocidas como refugios (Haffer, 1969; Lourenço, 1986). Sin embargo, otros autores disienten con la teoría de los refugios y han presentado argumentos validados mediante análisis de la paleobiota a través del espectro palinológico, y apoyados por observaciones geomorfológicas, que los han llevado a proponer que estas selvas permanecieron estables desde los comienzos del Cuaternario, lo que justificaría su alta biodiversidad (Colinvaux, 1997, 2000). En este último escenario, se ha reconsiderado la teoría conocida como “*Hipótesis de la Barrera del río*”, enunciada inicialmente por Wallace (1952)

para la cuenca amazónica, basada en que los ríos actúan como barreras de dispersión y que ha sido comprobada por varios trabajos (Avila-Pires, 1995; Patton, 2000).

Las subregiones biogeográficas de selva tropical Amazónica y Paranaense (Morrone, 2001) se encuentran separadas por la subregión Chaqueña (Figura 1), que constituye una franja de formaciones vegetales más abiertas que a su vez se diferencian en cinco Provincias Biogeográficas: la Provincia Caatinga, en el noreste brasileño, la Provincia del Cerrado que cubre la zona del Brasil Central, la Provincia del Chaco, que se extiende en Argentina y Paraguay, la Provincia de la Pampa presente en Argentina y Uruguay y la Provincia del Monte, en Argentina. La Subregión Chaqueña en su conjunto constituye la mayor disyunción de Sudamérica, conformando un corredor seco que actúa como una barrera para la migración de especies y poblaciones entre ambas selvas tropicales (Brieger *et al.*, 1969; Muller, 1973). Sin embargo, la red hidrográfica con su vegetación circundante, así como los parches selváticos que actualmente se encuentran dentro de los límites de los dominios xerófilos centrales, han permitido flanquear la barrera de este corredor seco, actuando como verdaderas rutas entre ambas formaciones selváticas (Redford & Fonseca, 1986; Oliveira-Filho & Ratter, 1995; Costa, 2003).

Los bosques secos estacionales del centro de Sudamérica quedaron sumergidos dentro de unidades vecinas de vegetación como las Yungas o el Chaco. Particularmente, la República del Paraguay se encuentra dividida en sentido norte-sur por el Río Paraguay, cuya vegetación siempre se consideró como una transición entre los biomas chaqueño y paranaense. Según Oakley & Prado (2011) existe una tendencia a incluir los bosques del Paraguay Oriental en la Selva Atlántica, sin embargo son remanentes de ésta, situados hacia el interior del continente y con características propias (Mereles, 2004). Por otro lado, Oakley & Prado (2011)

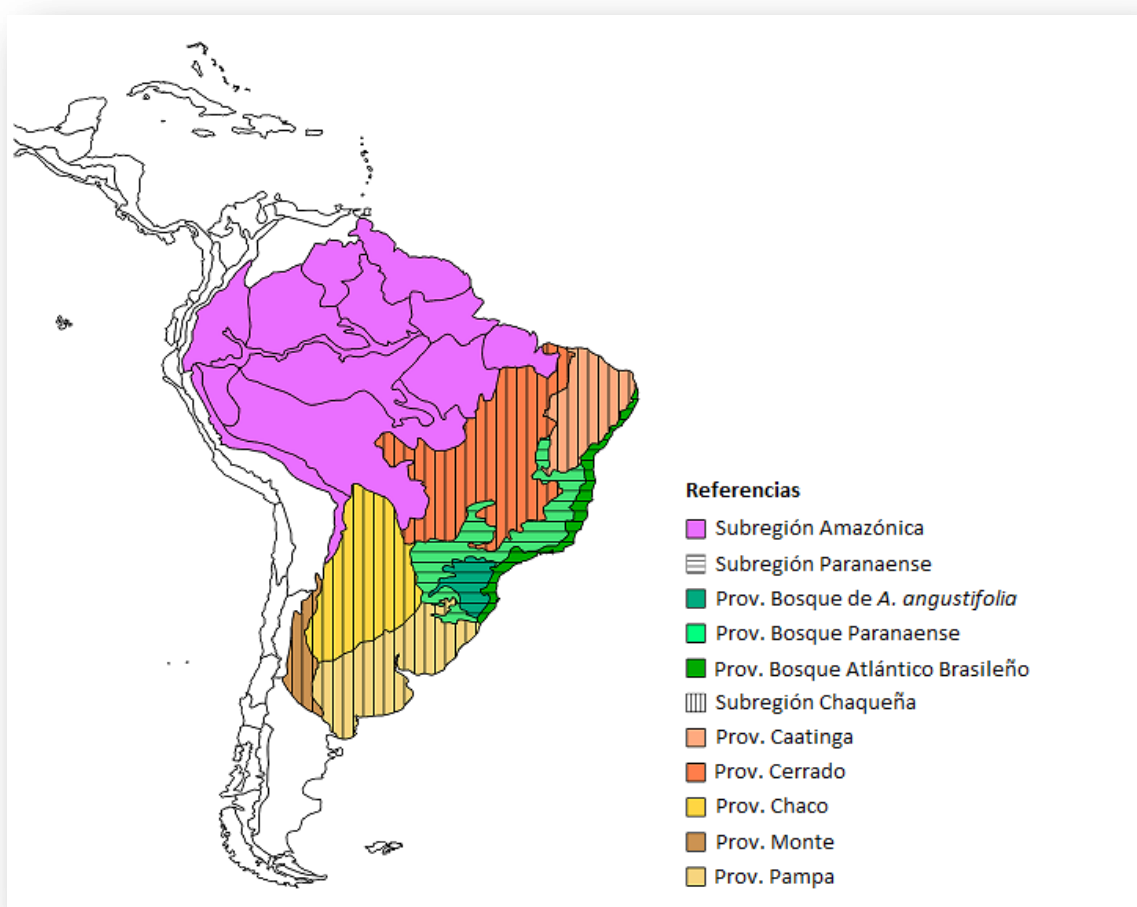


Figura 1. Subregiones y Provincias Biogeográficas de América del Sur mencionadas en el texto (Morrone, 2001).

mencionan la existencia de remanentes vestigiales de selvas ribereñas provenientes de la Subregión Paranaense, reconociendo el aporte de ésta hacia el interior del continente. No obstante, resaltan una característica especial del sistema de los ríos Paraguay y Paraná que comunica ambientes de climas tropicales, desembocando en regiones templadas, actuando de esta manera como corredor biogeográfico fluvial. Esta proposición se basa en la observación del linaje amazónico de muchas de las especies de las selvas en galería de ambos ríos hasta el Delta del río Paraná (Oakley *et al.*, 2005).

I.2 Aspectos geomorfológicos de la región mesopotámica

La interpretación de los patrones actuales de distribución de las formaciones selváticas se explica, en parte, a través de procesos ecológicos como a través de eventos geomorfológicos. En este contexto, es necesario tener presente los acontecimientos geológicos más relevantes ocurridos en la región mesopotámica de Argentina.

La provincia de Misiones, Corrientes y parte de Entre Ríos comparten una historia geológica pre-neógena común con el sur de Brasil, Uruguay y parte de Paraguay (Orfeo & Neiff, 2008). Varios de estos procesos tuvieron un papel importante en la formación del curso del río Paraná en la actualidad. El basamento de la cuenca del río Paraná está formado por rocas graníticas que datan del Precámbrico y el Paleozoico. Durante el Pérmico la cuenca acumuló sedimentos marinos y continentales, mientras que ya en el Mesozoico se depositaron arenas, limos y arcillas de origen fluvio-lacustre. Posteriormente, en el periodo Jurásico un enorme desierto se desarrolló en la región, con dunas eólicas que conformaron la actual Formación Botucatú o Solari (Herbst, 1971).

Hacia fines del Mesozoico se produjeron importantes efusiones volcánicas cuyos afloramientos basálticos se conocen como Formación Serra Geral-Arapey, en sincronía con la separación del supercontinente Gondwana. Esta cubierta basáltica se intercala y sobrepone con las areniscas de mayor antigüedad. Más tarde, el levantamiento de la cordillera de los Andes, ocurrido durante el cenozoico, ejerció una compresión que provocó la fractura y ruptura de la capa basáltica, provocando su fragmentación con la consecuente inclinación de los bloques generados. Ya durante el Mioceno, se produjo una transgresión marina por el Río de la Plata, el llamado Mar Paranaense, con sus aguas templadas a cálidas, cubriendo la cuenca chaco-paranaense y la región oriental de la Mesopotamia. Como consecuencia se registraron sedimentos de origen marino y la generación de extensas áreas palustres con depósitos de arcilla, carbonatos y yeso (Orfeo & Neiff, 2008).

El ascenso de la cordillera de los Andes provocó uno de los lineamientos estructurales más importantes de la Mesopotamia, que atraviesa la provincia de Corrientes en sentido noreste-sudoeste, la fractura Ituzaingó-La Paz. Esta falla divide la provincia en dos bloques, siendo el occidental más hundido y el oriental más elevado, ambos inclinados hacia el este. A su vez, esta característica del subsuelo constituye el límite oriental de los Esteros del Iberá y la divisoria de aguas de la provincia. Durante el Plioceno el río Paraná escurría por las zonas actualmente ocupadas por los esteros del Iberá y por el río Corriente (Popolizio, 2006; Orfeo & Neiff, 2008).

Pocos kilómetros al oeste de la localidad de Ituzaingó comienzan a aflorar sedimentos de la Formación Ituzaingó, tanto en territorio argentino como paraguayo. Aguas arriba, el río Paraná corre sobre el lecho rocoso provisto por los basaltos. Sin embargo, en este segmento del curso, las rocas basálticas desaparecen de la superficie, exactamente donde se ubican los

“Saltos de Apipé”. Se ha postulado que a partir de este punto, el río Paraná se abría en numerosos brazos en un enorme abanico aluvial húmedo ocupando los actuales Esteros del Iberá en territorio argentino y los Esteros de Ñeembucú en Paraguay (Herbst *et al.*, 2000; Orfeo & Neiff, 2008; Popolizio, 2006).

I.3 Estado de conservación de las formaciones selváticas de América del Sur

La Subregión Biogeográfica Paranaense comprende tres provincias: el Bosque Atlántico Brasileño, el Bosque Paranaense y el Bosque de *Araucaria angustifolia*, estando las dos primeras más estrechamente relacionadas entre sí (Morrone & Coscarón, 1996; Morrone, 2001). Como unidad biogeográfica, la subregión Paranaense constituye uno de los 25 *hot-spots* de biodiversidad reconocidos en el mundo. Incluye áreas que han perdido al menos el 70% de su vegetación original, pero que en conjunto albergan a más del 60% de todas las especies terrestres del planeta, aun cuando estas áreas de alta biodiversidad ocupan menos del 2% de la tierra. Se trata de uno de los ecosistemas probablemente más devastados y más gravemente amenazados del planeta donde el ritmo de cambio es uno de los más acelerados. Aunque el área de cobertura se estima entre 1 y 1,5 millones de km², existe tan sólo un 7,8% de los bosques originales, es así que surge la necesidad imperiosa de adoptar medidas que provoquen o generen acciones inmediatas para su conservación (Galindo-Leal & Gusmão Câmara, 2005a; Giraudo *et al.*, 2005).

La Provincia del Bosque Paranaense, en su totalidad, comprende las selvas y sabanas del interior del sudeste de Brasil, el este de Paraguay y el noreste argentino (Morrone, 2001). Particularmente en Argentina comprende la provincia de Misiones y el noreste de Corrientes. Estas selvas, que una vez fueron continuas, actualmente representan una colección de cientos

de pequeños fragmentos, donde cada uno, independientemente de su tamaño, puede desempeñar un rol importante en la conservación de ciertas especies (Turner & Corlett, 1996). Según Viana *et al.* (1992) los fragmentos tienden a asumir una importancia creciente en la conservación de la diversidad biológica de las selvas, debido a que difieren en muchos aspectos del continuo original debido a que su composición y estructura continúan cambiando, incluso aún después de haber sido aislados (Galindo-Leal, 2005c).

A pesar del conocimiento en cuanto a los cambios en la dinámica y estructura de las poblaciones naturales fragmentadas, los remanentes de la Subregión Paranaense continúan deteriorándose debido a la extracción de leña, la tala ilegal, la captura furtiva de plantas y animales y la introducción de especies exóticas. Por otra parte, la construcción de represas para la producción de energía hidroeléctrica ha contribuido sustancialmente con la pérdida de hábitat y ha causado cambios ecológicos en la región (Galindo-Leal & de Gusmão Câmara, 2005a).

I.4 Las selvas ribereñas de la Provincia del Bosque Paranaense

Entre las diferentes formaciones selváticas de la Provincia del Bosque Paranaense se distingue las selvas marginales, son selvas higrófilas de las riberas de los ríos y sus afluentes (Cabrera, 1976). Dentro de éstas, un tipo vegetacional particular se destaca por presentarse en suelos encharcados casi en forma permanente y se encuentra rodeado de vegetación estructural y florísticamente diferenciada, la que es llamada “floresta higrófila”, “*mata de brejo*” (Leito-Filho, 1982) o “floresta estacional semidecidual” ribereña con influencia fluvial permanente (Ribeiro Rodrigues, 2000).

Las selvas fluviales o ribereñas contribuyen positivamente a la conservación de la biodiversidad, tanto por su papel como corredor ecológico como por su condición de banco de material genético, garantizando la preservación y perpetuación de muchas especies (De Souza, 2006). Como componente de las planicies inundables, también tienen funciones importantes, entre éstas retardan el escurrimiento, actúan como moduladores del balance entre erosión y sedimentación, y entre la acumulación y transferencia de nutrientes en las cuencas (Neiff, 2004). Sin embargo, en la actualidad las selvas ribereñas son blanco de numerosas perturbaciones antrópicas, entre las que podemos enumerar: (a) la destrucción de hábitats debido a la deforestación, (b) la expansión de núcleos urbanos, y (c) la tala para la utilización de la tierra con diversos fines (Silva *et al.*, 1995; Biganzoli & Múlgura, 2004; De Souza, 2006), conllevando a una pérdida de biodiversidad que puede incluir la pérdida de ecosistemas, poblaciones, variabilidad genética y especies, así como también la pérdida de los procesos ecológicos y evolutivos necesarios para mantener la diversidad (Galindo-Leal & Gusmão Camara, 2005a).

Las perturbaciones antrópicas han provocado una extensa fragmentación de las selvas ribereñas. La fragmentación del hábitat está determinada por dos procesos: la reducción del área total y la creación de parches aislados pertenecientes a la distribución que anteriormente fuera continua. Como consecuencia, disminuyen los tamaños de las poblaciones y se reduce la tasa de migración (flujo génico) entre los fragmentos, aumentando la divergencia genética entre las poblaciones remanentes (Frankham *et al.*, 2006).

De esta forma, la pérdida de biodiversidad se inicia con la reducción de la variabilidad genética y las interacciones ecológicas y termina con la extinción local de poblaciones de plantas y animales. La extinción de especies representa una pérdida inmensurable, ya que

cada especie contiene información genética única, típicamente moldeada por complejas interacciones ecológicas a lo largo de millones de años de evolución (Galindo-Leal *et al.*, 2005b). La evidencia creciente de extinción de poblaciones y especies sugiere que el planeta puede estar experimentando uno de los grandes episodios de extinción de su historia (Vitousek *et al.*, 1997; Myers *et al.*, 2000; Hilton-Taylor, 2000; Brooks *et al.*, 2002).

Las iniciativas de conservación en la Subregión Paranaense deben lidiar con la realidad de remanentes de vegetación perturbados y dispersos. Por ello, es importante describir los patrones de distribución de biodiversidad en estas áreas ya que esta información es esencial para la preparación de proyectos y políticas estatales de conservación. A pesar de la gran importancia para las ciencias de la conservación, los estudios de este tipo sobre la Subregión Paranaense son aún escasos (Metzger, 1997; Tabarelli & Mantovani 1999; Nunes *et al.*, 2003, en Pereira *et al.*, 2007).

En lo que a conservación de las poblaciones naturales se refiere, es muy importante considerar dos alternativas, la conservación *in situ* y *ex situ*, estando la primera orientada al mantenimiento de la especie en su ambiente natural (Dias & Kageyama, 1991). A partir de esta consideración, surge la necesidad de conservación, manejo y recuperación de fragmentos forestales, lo que requiere un abordaje que involucre conocimientos y metodologías tanto del campo de la ecología como de la genética de poblaciones (Kageyama *et al.*, 1998).

I.5 *Calophyllum brasiliense*, especie característica de selvas higrófilas

Lobo & Joly (2000) indican que en las selvas higrófilas existen especies características citando entre otras a *Calophyllum brasiliense* Cambess., resaltando además, su ausencia en

otros ambientes. Esta especie fue agrupada entre las especies tolerantes a la inundación, con preferencia por los suelos encharcados, que en general se presentan con altos valores de dominancia, densidad y frecuencia (Marques *et al.*, 2003). Es considerada una especie forestal “rara” por formar pequeñas manchas de ocupación alejadas de su hábitat normal, muy localizadas y casi siempre puras (Sanjurjo, 1994).

El género *Calophyllum* antes perteneciente a la familia Clusiaceae, ha sido reubicado en la familia Calophyllaceae, junto a otros quince géneros. Este cambio fue propuesto por Wurdack & Davis (2009) a partir de filogenias moleculares. A continuación se detalla la taxonomía adoptada para la especie en el presente trabajo:

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Rosanae Takht.

Orden: Malpighiales Juss. ex Bercht. & J. Presl

Familia: Calophyllaceae J. Agardh

Género: *Calophyllum*

Especie: *Calophyllum brasiliense* Cambess.

La especie *Calophyllum brasiliense* Cambess. se distribuye desde el sur de México hasta el sudeste de Brasil y Paraguay (Figura 2) en las selvas higrófilas de las subregiones biogeográficas Paranaense, Amazónica y en determinados lugares de la Subregión Chaqueña, desde América Central hasta el litoral norte catarinense, y selvas de Paraguay, siempre en condiciones de suelos húmedos, y ha sido ampliamente estudiada por diferentes autores (Reitz



Figura 2. Distribución geográfica de *C. brasiliense*. **Marcas de posición:** **Verdes:** Registros de Trópicos¹ (Missouri Botanical Garden - MBG) y Herbario de la Facultad Nacional de Asunción. **Rojas rodeadas por círculo:** Poblaciones recientemente descritas.

¹www.tropicos.org

et al., 1978; Oliveira-Filho & Ratter, 1995, en Marquez & Joly, 2000; Fischer & Dos Santos, 2001; Da Silva *et al.*, 2007). En Argentina, esta especie fue recientemente hallada (Rodríguez *et al.*, 2009) en selvas marginales o ribereñas (Cabrera, 1976). No obstante las selvas ribereñas argentinas y del sur de Paraguay fueron luego reasignadas a los tipos vegetacionales brasileños de “Selvas Umbrófilas Densas Aluviales”, “Selvas Umbrófilas de Tierras Bajas” y “Selvas Estacionales Semideciduales Aluviales” de acuerdo a la clasificación de Veloso *et al.* (1991), frente a esta situación surge la necesidad de realizar nuevas contribuciones para una correcta caracterización fitogeográfica. En este sentido, se ha propuesto el análisis de los patrones ecológicos y filogeográficos (Rodríguez *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, en preparación) de las poblaciones de *C. brasiliense*.

C. brasiliense, es un árbol de 15-20 m de altura, de corteza grisácea y áspera, surcos longitudinales y anchas costillas con grietas horizontales y verticales (Figura 3a-b). Las hojas son opuestas, glabras, pecíolo de 1-2 cm de longitud, la lámina es coriácea, discolora (Figura 3c). Presenta inflorescencias en racimos axilares, las flores son blancas, masculinas, femeninas y bisexuales, si bien ésta última condición está en revisión (3f-g). El fruto es una drupa globosa, verde a la madurez, de aproximadamente 2 cm de diámetro (Figura 3d-e). Esta especie es conocida vulgarmente en Paraguay y Argentina como “arary” y en Brasil con los nombres “olandi”, “landim”, “landi”, “olandim”, “guanandi”, “guanadi-cedro”, “guanandi-carvalho”, “guanandi-rosa”, “cedro de pantano” y “palo María”, entre otros (Reitz *et al.*, 1978; Hueck, 1978).

Desde el aspecto ecológico, arary está asociada con los helechos *Cyathea atrovirens* y *Blechnum brasiliense*, la leguminosa *Inga laurina*, la burmaniácea *Apteria aphylla*, la triuridácea *Peltophyllum luteum* (Krauczuck *et al.*, 2013) y una arácea *Dieffenbachia*

aglaonematifolia (Rodríguez *et al.*, 2009); y su fruto (Figura 3e) es parte de la dieta de *Artibeus lituratus*, un murciélago que se alimenta de ellos dispersando las semillas (Passos & Graciolli, 2004).

La importancia económica de *C. brasiliense*, reside en la excelente calidad de su madera utilizada en la confección de quillas, mástiles, costillas y armaduras de embarcaciones así como para muebles finos, parquet, ebanistería, durmientes y estructuras robustas en general debido a la dureza de la madera (Hueck, 1978). Se emplea como sustituto del cedro y la caoba. El aceite de la semilla se utiliza con buenos resultados en algunas enfermedades cutáneas. Distintos extractos de las hojas tienen acción molusquicida capaz de eliminar a *Biomphalaria glabrata*, cuyo control resulta fundamental en la erradicación de la esquistosomiasis (Gasparotto *et al.*, 2005) y acción antiviral por inhibir al VIH-1 (Huerta Reyes, 2004). Asimismo, los extractos de la corteza y del fruto presentan acción antitumoral (Kimura *et al.*, 2005).

En la literatura, son varios los trabajos relacionados con la caracterización genética de poblaciones de *C. brasiliense*. Se mencionan estudios basados en marcadores isoenzimáticos en poblaciones de la Estación Ecológica de Panga de Uberlândia, Mato Grosso – Brasil (BR) (Kawaguici & Kageyama, 2001) y en marcadores AFLPs, obtenidos a partir del análisis de remanentes de Pará-BR, Río de Janeiro-BR, Minas Gerais-MG-BR y Costa Rica (Carnavale-Bottino, 2006). Posteriormente se analizaron dos poblaciones del estado de MG utilizando marcadores RAPDs y se obtuvieron patrones de distribución de variabilidad genética esperados para especies arbóreas, siendo mayor la diversidad genética dentro de las poblaciones que entre éstas, con un nivel de divergencia considerablemente alto (Galvão Mendoça, 2006). Las mismas poblaciones fueron analizadas mediante isoenzimas (Botrel *et*



Figura 3. *Calophyllum brasiliense*. **a.** Porte del árbol. **b.** Detalle de la corteza. **c.** Brotes nuevos. **d.** Detalle de la hoja. **e.** Frutos. **f.** Flor femenina con estaminodios. **g.** Inflorescencia masculina.

al., 2006). Haciendo uso de los mismos marcadores, De Souza *et al.* (2009) compararon otras dos poblaciones de MG y Reis *et al.* (2009) analizaron la estructura genética espacial de distintas clases de edad en una población. En el año 2011 se conocieron los resultados de un estudio de genética de poblaciones realizado para planificar la colecta de semillas en nueve poblaciones del estado de Santa Catarina-BR, siendo éstas las más australes analizadas (Santos da Silva, 2011). En las poblaciones argentinas de *C. brasiliense*, se ajustaron las técnicas moleculares para obtener marcadores RAPDs a partir de tejido foliar de individuos de una población de San Ignacio (Percuoco, 2007). Si bien este trabajo permitió realizar ajustes de la técnica no existen caracterizaciones previas de la estructura genética de dichas poblaciones, que evidencien la magnitud de la variabilidad genética contenida en las mismas y que permitan elaborar estrategias de manejo para su conservación.

La estructura filogeográfica de 23 poblaciones de la especie fue estudiada por Neri *et al.* (2011). Este grupo de trabajo analizó poblaciones de Brasil, ubicadas en el Bosque Atlántico Brasileño y selvas en galerías y ciliares de la Subregión Chaqueña de Brasil (Caatinga y Cerrado). La estructura genética encontrada a partir de la distribución de 9 haplotipos surgidos del análisis de dos regiones intergénicas del genoma cloroplástico apoyan la hipótesis que postula la existencia de refugios en la región del Cerrado durante los periodos glaciares del Cuaternario, desde donde se habría producido la dispersión hacia la Subregión Paranaense. La presencia de un haplotipo compartido por todas las poblaciones de esta región, excepto una, señala la colonización reciente de esta región por efecto fundador.

I.5.1 Las nuevas citas de *Calophyllum brasiliense* Cambess. en Argentina y Paraguay

Investigaciones recientes efectuadas en las comunidades de selvas ribereñas de Misiones y Corrientes, condujeron al hallazgo de las poblaciones de “arary” en Argentina por

parte de Rodríguez *et al.* (2009). Éstas se encuentran ubicadas al sur de la provincia de Misiones, en la localidad de San Ignacio y en el noreste de la provincia de Corrientes en la localidad de Rincón Ombú. El estudio de la estructura ecológica de ambas evidenció que se trata de poblaciones con pocos individuos adultos y alto reclutamiento, por lo que están en crecimiento continuo (Percuoco *et al.*, 2009). En el transcurso de los últimos años se ha identificado una tercera población, ubicada en la localidad de Puerto Valle (Corrientes), cercana a los Esteros del Iberá, representando el registro más austral para “arary”.

En lo que respecta a Paraguay, en el Herbario de la Universidad de Asunción se encuentran informados tres registros para *C. brasiliense*, en los departamentos paraguayos de Concepción, Central y Misiones, a los que en este trabajo se sumaron muestras provenientes de la localidad de Ayolas y de la Isla Yacyretá (Depto. Misiones).

De esta manera, se han identificado nuevos parches de selvas ribereñas con presencia de la especie, los que contribuirán a explicar con mayor certeza la distribución de estas formaciones vegetales en el pasado y la forma en que se encuentra particionada la diversidad genética entre los remanentes. En términos de aplicabilidad, este conocimiento contribuirá en el diseño de estrategias para la conservación de estos ambientes.

I.5.2 Situación de las poblaciones más australes de *Calophyllum brasiliense*

Las poblaciones de *C. brasiliense* identificadas en Argentina y Paraguay se encuentran restringidas a pequeñas áreas con las condiciones de suelo y humedad adecuadas para su supervivencia. Sin embargo, a estos factores limitantes naturales se suman actividades humanas que han llevado a que las selvas ribereñas se hayan fragmentado significativamente. El desarrollo agrícola-ganadero y la explotación forestal se cuentan entre las principales

actividades económicas de la región, con la consecuente remoción de bosques nativos y cambios en el uso del suelo.

No obstante, uno de los impactos más negativos que han recibido las comunidades costeras lo constituye la construcción de la represa hidroeléctrica Yacyretá-Apipé sobre el río Paraná a la altura de la localidad correntina de Ituzaingó. El embalse generado inicialmente, y las sucesivas inundaciones efectuadas, hasta alcanzar en febrero de 2012 la cota máxima prevista de 83 m.s.n.m., han dejado bajo agua gran parte de estos ambientes, especialmente en San Ignacio y Rincón Ombú, donde incluso se han perdido varios individuos analizados en el presente trabajo. Por otro lado, en los últimos años se ha acrecentado en forma notable el movimiento turístico en zonas costeras del río Paraná, particularmente en San Ignacio, por lo que se continúan construyendo complejos recreativos de gran afluencia en sitios muy cercanos a estos relictos de vegetación ribereña.

Afortunadamente, las poblaciones de “arary” de Misiones se encuentran en reservas o refugios privados, teniendo de esta manera algún grado de preservación. Por su parte, el remanente de Puerto Valle, lindante a los Esteros del Iberá, se encuentra dentro de una empresa forestal, y, si bien es mantenido como reserva compensatoria, está en interacción con especies forestales exóticas. De la misma manera, son conservados los bosques con *C. brasiliense* ubicados en la Isla Yacyretá, dentro de los límites de la reserva compensatoria de la Entidad Binacional Yacyretá. Sin embargo, el pequeño tamaño y número de los remanentes, la escasez de estudios de caracterización y el desconocimiento del valor intrínseco de estas comunidades los ponen en situación de peligro de extinción local.

I.6 La caracterización genética como herramienta para la conservación de las poblaciones

En sus inicios, la aplicación de la genética a la conservación surgió como respuesta a la pérdida de variedades silvestres o primitivas de cereales cultivados, siendo reemplazadas por cultivares uniformes. A partir de entonces la interacción entre ambas disciplinas llevó a reconocer la importancia del mantenimiento de la integridad de las poblaciones locales, hasta instalarse definitivamente en un contexto general que apunta a la aplicación de los conceptos de genética a la conservación de la biodiversidad, convirtiéndose en un campo bien establecido en la actualidad. Las principales aplicaciones que emergen de la genética de la conservación son el manejo y la reintroducción de poblaciones en cautiverio, restauración de comunidades biológicas, descripción e identificación de individuos, caracterización de la estructura genética poblacional, relaciones de parentesco y relaciones taxonómicas; detección y predicción de los efectos de pérdida de hábitats, de la fragmentación y el aislamiento, entre muchas más. Sin embargo, la interpretación de esta explosión de información requiere una sólida construcción teórica de la genética de poblaciones (Allendorf *et al.*, 2013).

Las múltiples modificaciones que tienen lugar en los ambientes naturales resaltan el concepto y la importancia de la variabilidad genética. La diversidad genética es uno de los atributos más importantes de cualquier población, sobre la que continuamente actúa la selección natural y/o neutral permitiendo que las poblaciones se adapten a nuevas situaciones. Una diversidad baja generalmente conlleva a un incremento en los niveles de endogamia, lo que puede causar una disminución de la eficacia biológica de los individuos y la población (Frankham *et al.*, 2006; Freeland, 2005).

La distribución de la variabilidad dentro de una población está determinada por las características demográficas e historia de la misma. Por lo que el destino de una variante genética en el tiempo y en el espacio, se verá influenciado por la biología y por las circunstancias que atraviesa el individuo a lo largo de su historia, incluyendo sucesos reproductivos, migración, tamaño poblacional, selección natural y eventos históricos (Sunnucks, 2000).

La estructura genética actual de las poblaciones vegetales es el resultado de la interacción de diferentes procesos, incluidos selección natural, mutación, deriva, flujo génico, sistema reproductivo e historia evolutiva de la especie. Ésta última, a su vez involucra factores ambientales tales como cambios en la distribución, fragmentación del hábitat y aislamiento poblacional (Slatkin, 1987, en Sales *et al.*, 2001). Particularmente, la estructuración de la diversidad genética se presenta a diferentes niveles jerárquicos, sea entre poblaciones, subpoblaciones o entre individuos dentro de poblaciones (Escudero *et al.*, 2003).

Por lo tanto, el conocimiento de la variabilidad genética de las poblaciones es importante para establecer estrategias de conservación de las especies y sus hábitats (Botrel *et al.*, 2006). Los estudios genéticos y ecológicos de las especies o poblaciones en riesgo han demostrado el efecto de la alteración antropogénica en las poblaciones naturales, ayudando a definir los parámetros genéticos adecuados para guiar y monitorear las acciones para la conservación de estos ecosistemas (Kageyama *et al.*, 1998).

I.7 La estructuración de la diversidad genética en las poblaciones naturales

El análisis genético-espacial de las poblaciones naturales tiene como objetivo evaluar y cuantificar la forma en que se distribuye la variabilidad genética en el tiempo y el espacio permitiendo realizar inferencias respecto de patrones de distribución en el pasado o predicciones para el futuro (Crisci *et al.*, 2000; Crisci, 2001; 2003; Estopa, 2006). De este modo contribuye a la resolución de interrogantes taxonómicos, filogenéticos, demográficos y ecológicos convirtiéndose en un prerequisite para el diseño de estrategias de conservación (Torres *et al.*, 2003).

En este sentido, la fragmentación de las selvas trae aparejado una reducción del número de individuos de las poblaciones, con la consecuente pérdida de variación genética (variedad de alelos y genotipos presentes en el grupo bajo estudio), resultando en una disminución del potencial adaptativo y la eficacia biológica promedio en la población, afectando directamente la viabilidad poblacional y la evolución adaptativa (Frankham *et al.*, 2002; Godoy, 2009). Cuando se considera la variabilidad genética con miras a la conservación, se deben analizar dos niveles jerárquicos fundamentales: la diferenciación genética entre individuos dentro de las poblaciones y entre poblaciones de la misma especie (Allendorf *et al.*, 2013).

Es por ello que la implementación de programas de conservación para cualquier especie tiene como prerequisite conocer la variabilidad genética y su distribución dentro de las poblaciones naturales. La biología de la conservación a menudo utiliza información acerca de la distribución de la variación genética dentro y entre las poblaciones para establecer prioridades y planificar estrategias de mantenimiento de la diversidad. Particularmente, los conocimientos acerca de la problemática de la fragmentación de las selvas ribereñas, así como

la estructura y el funcionamiento de las especies componentes, son fragmentarias e insuficientes (Kawaguici & Kageyama, 2001).

I.8 El análisis filogeográfico: factores históricos y distribución geográfica de linajes

El término filogeografía fue acuñado por Avise (1987) para describir el componente genealógico observado durante el análisis de linajes de ADNmitocondrial (ADNmt) en poblaciones naturales, que reflejaba la distribución espacial de los genotipos dentro y entre especies relacionadas. Como subdisciplina de la biogeografía, estudia los procesos y principios que determinan la distribución geográfica de los linajes de genes, dándole un mayor contexto temporoespacial que las perspectivas ecogeográficas tradicionales (Posadas *et al.*, 2006). Éstas últimas describen y explican los patrones geográficos de las poblaciones basados en procesos ecológicos contemporáneos (Avise, 2000). La filogeografía, en tanto, resalta la influencia de factores históricos sobre la distribución geográfica de los linajes. La tendencia a la variación entre las poblaciones respecto a la variación dentro de las mismas, permite utilizar los genomas citoplasmáticos para estimar filogenias de poblaciones, y de esa forma investigar patrones de biogeografía histórica, esencialmente procesos de dispersión (Crisci *et al.*, 2000).

En cuanto a las metodologías de análisis, en filogeografía se aplican los mismos algoritmos que se emplean para reconstruir árboles de especies o taxones superiores, en el campo de la filogenética, dando como resultado cladogramas, en este caso llamados filogramas, que representan las relaciones genealógicas entre haplotipos y donde las ramas de diferentes longitudes reflejan la cantidad de cambio evolutivo (en términos, por ejemplo, de número de pasos mutacionales o número de sustituciones) (Vazquez & Domínguez, 2007).

De acuerdo con el modelo de evolución neutral propuesto por Kimura (1978), la mayoría de las mutaciones que surgen y se fijan en una población son de carácter neutral, producto de la deriva génica, de tal forma que todos los alelos de un gen en una población actual descienden de un único alelo ancestral. De este postulado se desprende que la tasa de mutación es constante a lo largo del tiempo. En consecuencia, el conocimiento de la tasa de cambio a nivel molecular permite inferir el tiempo de divergencia entre dos copias génicas, por lo que el grado de diferenciación entre ellas funcionaría como un reloj molecular (Futuyma, 2005). No obstante se ha demostrado que existen genes o linajes que parecen no estar de acuerdo con la hipótesis del reloj molecular (Schneider, 2007; Wilke *et al.*, 2009; Battistuzzi *et al.*, 2011). La historia genealógica de los genes constituye la base de la teoría de la coalescencia. De esta forma, al ver hacia atrás en el tiempo, los haplotipos de ADNmt, ADN cloroplástico (ADNcp) o de cualquier gen nuclear, eventualmente coalescen en el ancestro común. El tiempo de coalescencia depende de la estructura y el tamaño poblacional, permitiendo hacer inferencias acerca de la historia de la población (Harding, 1996; Futuyma, 2005). La teoría de la coalescencia sustenta el tratamiento matemático y estadístico formal de las genealogías de genes dentro y entre especies relacionadas (Vazquez & Domínguez, 2007).

I.9 Marcadores moleculares en la evaluación de la variación genética de las poblaciones naturales

Los múltiples factores bióticos y abióticos que influyen sobre las poblaciones naturales resultan en complejas estructuras (Hutchings, 1997), sumando dificultades a la hora de su caracterización. En las últimas décadas se han desarrollado innumerables marcadores moleculares que se han convertido en instrumentos eficaces para la investigación de la variación genética dentro de las especies (Mitton, 1994).

Los marcadores moleculares pueden clasificarse según varios criterios. Es posible distinguirlos según la biomolécula considerada, pudiendo basarse de esta manera en el análisis de proteínas, como los isoenzimáticos, o en el análisis de la molécula de ADN *per se*. En este segundo grupo encontramos los revelados mediante hibridación con sondas marcadas, y los obtenidos mediante amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reacción en Cadena de la Polimerasa). Estos últimos han reemplazado a los marcadores proteicos, debido a su mayor poder resolutivo y a que presentan una procesividad metodológica relativamente más simple (Joshi, 1999; Jiménez & Collada, 2000; Wink, 2007).

Un segundo criterio para clasificar a los marcadores moleculares a los fines del estudio de la estructura genética espacial es separarlos en dominantes y codominantes. Entre los últimos, se encuentran las isoenzimas y los microsatélites (o *Simple Sequence Repeats* - SSRs). En cambio, los *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPDs), los *Amplified Fragments Length Polymorphisms* (AFLPs) y los *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSRs), tienen carácter de dominantes y se analizan e interpretan como caracteres fenotípicos (codificados de acuerdo al doble estado presencia/ausencia) (Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990; Zietkiewicz *et al.*, 1994). En este caso, las frecuencias alélicas también pueden calcularse en forma indirecta y sus valores, emplearse para estimar los parámetros poblacionales clásicos (Lynch & Milligan, 1994).

Asimismo, los marcadores moleculares disponibles pueden clasificarse en función de sus tasas evolutivas. Aquel marcador escogido para el análisis deberá exhibir un grado de variabilidad que se ajuste al nivel de divergencia que se desea evaluar. Esto es, aquellos marcadores con altas tasas de cambio son útiles para el estudio de individuos y poblaciones, mientras que los que evolucionan de manera más lenta son utilizados generalmente en el

estudio de otros niveles jerárquicos (especies, taxones supraespecíficos) (Solé-Cava, en Mattioli, 2004).

I.9.1 Regiones de ADN polimórficas reveladas mediante cebadores de secuencia arbitraria (RAPDs)

La técnica de obtención de marcadores RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) fue desarrollada paralelamente por Williams *et al.*, (1990) y Welsh & McClelland (1990). Se trata de un ensayo simple basado en la amplificación al azar de segmentos de ADN genómico, utilizando cebadores o *primers* únicos de secuencia nucleotídica arbitraria (10mers en general) y con un contenido en GC mayor al 40%. Estos cebadores son capaces de detectar polimorfismos, aun cuando se carece de información respecto de la secuencia de ADN bajo estudio. De esta forma el polimorfismo puesto en evidencia *per se*, funciona como un marcador genético (Williams *et al.*, 1990). Estos polimorfismos así revelados pueden haberse originado por un simple cambio de un par de bases, inserciones o deleciones, que modifican o eliminan el sitio de anclaje del cebador, o asimismo inserciones en la secuencia genómica que provocan la separación de los sitios de apareamiento de los cebadores a una distancia que no es factible la amplificación (Xena de Enrech, 2000).

Los RAPDs exhiben varias ventajas entre las que se destaca la simplicidad del procedimiento, ya que no requiere etapas de transferencia a membranas e hibridación con sondas y autorradiografía (*e.g* RFLPs, *Restriction Fragments Length Polymorphisms*). En este caso los polimorfismos son detectados directamente por visualización en geles de agarosa teñidos con el colorante intercalar bromuro de etidio o similares. Por otro lado, no se requiere el desarrollo previo de bibliotecas específicas para el organismo de interés, evitándose el manejo de isótopos radioactivos u otras moléculas empleadas en el marcaje de sondas. Todos

estos factores redundan en la disminución del tiempo y el costo necesario para la obtención de los datos. Otra ventaja destacada de la técnica es la cantidad mínima de ADN requerida para la obtención de bandas detectables. Además, el empleo de *primers* arbitrarios ofrece la posibilidad de monitorear todas las regiones del genoma. A su vez, como la técnica se basa en la síntesis *in vitro* (PCR) de ADN, resulta mucho más sensible en la detección de polimorfismos que los RFLPs, por ejemplo. Dada su relativa practicidad, la técnica de RAPDs fue la elegida en la práctica cotidiana de estaciones experimentales, programas de mejoramiento, análisis de diversidad genética en poblaciones naturales y caracterización de bancos de germoplasma (Ferreira & Grattapaglia, 1996), sobre todo cuando la información genética de la especie es escasa o nula.

Entre las principales desventajas de los marcadores RAPDs, se encuentra el bajo contenido de información genética por *locus*, ya que resultan en marcadores dominantes, es decir, es amplificado sólo un segmento correspondiente a un alelo, siendo los restantes clasificados conjuntamente como alelos ausentes (Ferreira & Grattapaglia, 1996), lo cual se traduce en una pérdida de información si se los compara con marcadores codominantes como es el caso de las isoenzimas. Sin embargo, la técnica de RAPDs provee un gran número de marcadores genéticos y por lo tanto es más informativa acerca de la estructura de las poblaciones y su diversidad genética que la obtenida a través de marcadores tales como las isoenzimas (Xena de Enrech, 2000). Otra limitación importante es la baja reproducibilidad de la técnica, tanto entre laboratorios con distintos equipamientos, como en los patrones obtenidos de los mismos individuos en distintos procesamiento del mismo laboratorio (Karp & Edwards, 1995).

I.9.2 Regiones de ADN polimórficas reveladas mediante cebadores anclados en regiones microsatélites (ISSRs)

Los marcadores RAPDs fueron ampliamente aceptados especialmente por su aplicabilidad a cualquier grupo taxonómico sin necesidad de conocimiento previo del genoma. Pocos años después, Zietkiewicz *et al.* (1994) desarrollaron otros marcadores de la misma naturaleza dominante y también capaces de amplificar múltiples *loci* en forma simultánea conocidos por su sigla en inglés ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeats*). A diferencia de los RAPDs, se basan en la presencia ubicua de repeticiones di-, tri-, tetra- y pentanucleotídicas, las que a su vez constituyen en sí mismas otro de los marcadores más informativos que existen, los SSRs (*Simple Sequence Repeats*). Los ISSRs se obtienen empleando *primers* cuya secuencia consiste en un motivo repetido n número de veces seguidos de 1 – 4 bases en sentido 5'→3', 3'→5', o en ambos, que actúan como anclas. Así se tienen cebadores de la forma (NN)₈R; (NN)₇RNNY; BDB(NN)₇N², entre infinitas posibles combinaciones. La técnica tiene la ventaja de amplificar mayor cantidad de regiones que los RAPDs, según el genoma de partida (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Este marcador aún es ampliamente empleado en genética de plantas para el estudio de la variabilidad dentro y entre poblaciones naturales y cultivares (Venkatachalam *et al.*, 2008; Rossiet *al.*, 2009), siendo a veces combinado con el análisis de RAPDs, ya que el tratamiento de los datos es el mismo (Dangi *et al.*, 2004; He *et al.*, 2007).

I.9.3 Marcadores hipervariables en el genoma de plantas: los microsatélites o SSRs

Los microsatélites (término acuñado por Litt & Luty, 1989), SSRs (*Simple Sequence Repeat*) o STRs (*Short Tandem Repeat*), son secuencias repetitivas de ADN que se han

²N: A, G, T, C; R: A, G; Y: C, T; B: C, G, T; D: A, G, T

encontrado en todos los genomas procariotas y eucariotas analizados hasta el momento, tanto en regiones codificantes como no codificantes, con mayor representación en las últimas (Zane, 2002). Consisten en repeticiones en tándem de unidades mono-, di-, tri-, tetra-, o pentanucleotídicas (Powell, 1996; Goldstein & Schlötterer, 1999).

Los SSRs se caracterizan por su elevado polimorfismo, neutralidad selectiva, abundancia relativa con una cobertura uniforme del genoma y patrón de herencia codominante. Es factible amplificarlos mediante la técnica de PCR, por lo que se han convertido en uno de los marcadores más utilizados en estudios de conservación y manejo de especies en peligro de extinción (Powell, 1996; González, 2003; Avise, 2004). Son atractivos en el caso de especies que muestran un bajo nivel de variación genética, poblaciones endogámicas y recientemente derivadas o poblaciones cercanas geográficamente, donde es difícil discernir la diferenciación por medio de otras aproximaciones (Rakoczy, 2004).

El principal inconveniente de los microsatélites es que deben ser aislados de *novo* para la mayoría de las especies que se examinan por primera vez. Esto se debe a que generalmente se encuentran en regiones no codificantes, donde la tasa de sustitución de nucleótidos es mayor que en las codificantes (Zane, 2002). El genoma de las plantas tiene una frecuencia relativamente más baja de microsatélites que el de especies animales, esto presenta problemas técnicos para el aislamiento de SSRs a gran escala. Además, el tipo más abundante de SSR en plantas, los dinucleótidos A-T, son difíciles de aislar de las bibliotecas debido a que generalmente son palindrómicos (Powell, 1996).

La estrategia alternativa de diseñar cebadores universales presenta dificultades para los microsatélites, aunque la presencia de regiones flanqueantes altamente conservadas ha

permitido la amplificación cruzada entre especies (Weising & Gardner, 1999; Provan, 2001; Hale *et al.*, 2004).

I.9.3.1 El origen del polimorfismo en regiones microsatélites

Los principales modelos mutacionales que explican el origen del polimorfismo en los *loci* son: **el modelo de Alelos Infinitos o IAM** (del inglés “*Infinite allele model*”), propuesto por Kimura & Crow (1964) y el modelo “**por pasos**” o **SMM** (del inglés “*stepwise mutation model*”), propuesto por Kimura & Ohta (1978). El segundo modelo asume que el polimorfismo se origina a través de la pérdida o ganancia, con igual probabilidad, de una única repetición. Este proceso originaría diferentes alelos que pueden ser idénticos en estado pero no necesariamente idénticos por descendencia, dada la presencia de mutaciones convergentes. Respecto a los SSRs, entre los mecanismos que tratan de explicar el origen del polimorfismo de longitud, uno de los más sostenido, es el que propone al deslizamiento o tartamudeo de la polimerasa durante la replicación del ADN (o *slippage*) (Schlotterer & Tautz, 1992). Este mecanismo implica una desnaturalización local y el desplazamiento de las hebras de ADN de doble cadena, formándose pequeños bucles, lo que causa un apareamiento de bases incorrecto en el lugar donde existe un SSR. Estas estructuras, si no son reparadas, darán lugar a un aumento o disminución del número de unidades repetidas, dependiendo de si el bucle se forma en la cadena sintetizada o en la parental, respectivamente (Levinson & Gutman, 1987), donde el tamaño de los alelos nuevos depende del tamaño de los alelos involucrados en la mutación (Di Renzo *et al.*, 1991). En este sentido se asume que muchos microsatélites se ajustan al SMM, considerando que no borran la información acerca del estado ancestral de los alelos. Algunos microsatélites, por ejemplo, exhiben una tendencia a la expansión, mientras que otros tienden a contraerse (Brinkmann, 1998; Gaggiotti *et al.*, 1999; Dauber *et al.*, 2000).

I.10 El genoma cloroplástico: la molécula de elección en estudios filogeográficos de plantas

El análisis filogeográfico de las especies animales generalmente se basa en la comparación de secuencias de ADNmt, debido a su elevada tasa evolutiva (Avise, 2000). En cambio, el ADNmt de las especies vegetales presenta diferencias profundas respecto del de otros taxones, que lo hacen inapropiado para el alineamiento y análisis de secuencias en búsquedas de polimorfismos. Palmer (1992) enumera estas diferencias, destacando que la mayoría corresponde a cambios estructurales del genoma. La organización, el tamaño y el orden de los genes cambian en cortos periodos temporales, siendo a veces efímeros incluso entre especies muy cercanas, mientras que la secuencia primaria evoluciona a una tasa 3-4 veces menor que el ADNcp, 12 veces menor al ADN nuclear (ADNn) y 40-100 veces menor que el ADNmt del reino animal. En concordancia, Wolfe *et al.* (1987) analizaron las tasas de sustitución nucleotídica en los tres genomas vegetales y encontraron que el ADNcp evoluciona a una tasa de mutación que resulta la mitad de la tasa de mutación observada en el ADNn. De cualquier modo es menos conservativo que el ADNmt en plantas, ya que la tasa de sustitución en los genes cloroplásticos es tres veces mayor. De esta manera, el ADNcp es el genoma de elección para estudios filogeográficos de especies vegetales ya que acumula modificaciones en su secuencia de manera más rápida que el ADNmt y ha permitido revelar la estructuración geográfica en numerosas especies (Avise, 2000).

Entre las características distintivas que posicionan al ADNcp como blanco de estudios filogeográficos intraespecíficos podemos citar: (a) se trata de un único cromosoma circular covalentemente cerrado y con un tamaño que varía entre 120 y 217 Kb (Palmer, 1991), (b) posee una mayor tasa de sustitución nucleotídica en comparación con el ADNmt (Wolfe *et al.*, 1987), (c) presenta una forma típicamente uniparental de transmisión, que le confiere un

modo clonal de evolución (característica única de los genomas organelares), dispersado generalmente a través de semillas y no por polen (Hamilton, 1999) (d) se encuentra densamente empaquetado, con una media de 115 genes identificados en tres de los genomas secuenciados totalmente en angiospermas (Shimada & Sugiura, 1991), si bien en los últimos años este promedio ascendió a 127 genes, calculado a partir de 416 genomas cloroplásticos de la división Streptophyta depositados en GenBank. La organización de estos genes es extremadamente conservada, exhibiendo una elevada sintenia (Palmer, 1987; Dumolting-Lapegue *et al.*, 1997). En lo que respecta a su estructura es importante señalar la existencia de una duplicación invertida (IR) que divide al cromosoma en una región de copia única pequeña (SSC) y una grande (LSC) (Figura 4) (Shinozaki *et al.*, 1986). La mayor parte de la variación en tamaño del ADNcp es debida precisamente a la variación en tamaño de las regiones de repetición invertida (IR) y a las regiones espaciadoras (Shimada & Sugiura, 1991), por todas estas consideraciones se ha transformado, además, en la macromolécula de elección para estudios evolutivos.

En un principio, el ADNcp había sido empleado principalmente a nivel interespecífico para establecer filogenias. Se pensaba que el genoma cloroplástico era demasiado conservado como para ser utilizado a nivel intraespecífico. Sin embargo los trabajos de Petit *et al.* (1993) y McCauley (1995) proveyeron el marco teórico desde el cual explicar observaciones novedosas acerca de la historia y la dinámica de las poblaciones de plantas. No obstante, la baja tasa de mutación asociada al genoma cloroplástico, significó una barrera metodológica importante en la detección de variaciones suficientes para la aplicación de este marco conceptual (Provan *et al.*, 2001). Sin embargo, se comprobó que los polimorfismos intraespecíficos en el ADNcp son mucho más frecuentes de lo que alguna vez se creyó (Olmstead & Palmer, 1994; McCauley, 1995; Ouborg *et al.*, 1999). Los niveles de

polimorfismos dependen de los taxones investigados y la región del ADNcp escogida para el análisis. Algunas regiones están altamente conservadas, mientras que otras, como espaciadores intergénicos e intrones, son más variables, inclusive a la escala de (meta) poblaciones (Gielly & Taberlet, 1994).

Más allá de lo expuesto precedentemente, en plantas, prevalece la idea de que la detección de polimorfismos informativos a nivel poblacional suele ser bastante dificultoso debido al bajo número de sustituciones en el genoma cloroplástico (Shaw *et al.*, 2005). A pesar de esta concepción, es importante mencionar que los estudios filogeográficos se han hecho casi en su totalidad con ADN citoplasmático: mitocondrial y cloroplástico (Demesure *et al.*, 1996; Richards *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 2002). Apenas recientemente el uso de haplotipos nucleares parece ser más frecuente y exitoso conforme se han desarrollado las técnicas moleculares y de interpretación (Bai *et al.*, 2010; Madulyn *et al.*, 2011). Ello ha sido motivado también como resultado de la necesidad de evaluar modelos históricos más sofisticados, lo que exige la utilización de diferentes marcadores complementarios que permitan descifrar la historia completa de los patrones genealógicos observados en las poblaciones naturales (Carbone & Kohn, 2001; Hare, 2001). El uso de *loci* nucleares diploides en análisis filogeográficos conlleva complicaciones, como la influencia de la selección y el factor temporal en los patrones estudiados, pero varios trabajos han demostrado la factibilidad del análisis e interpretación filogeográfica (Hare, 2001; Timmermans *et al.*, 2005; Vázquez-Domínguez, 2007; Hu *et al.*, 2008).

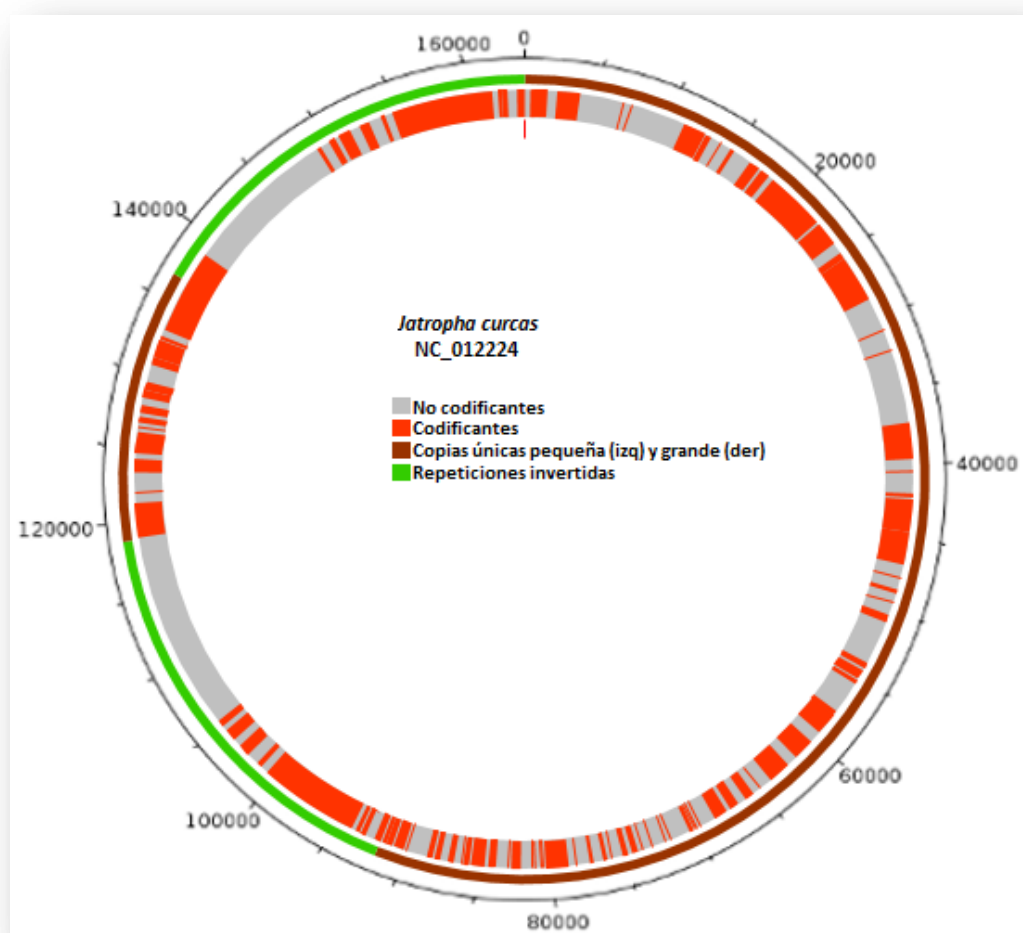


Figura 4. Representación esquemática del genoma cloroplástico típico de angiospermas. Se detallan características estructurales y naturaleza de las secuencias. Realizado en base a la secuencia completa del ADNcp de *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae – Malpighiales) NC_012224.

I.10.1 Marcadores genéticos en el genoma plastidial

I.10.1.1 Regiones cloroplásticas informativas

En las últimas dos décadas se han desarrollado varias estrategias tendientes a justificar el empleo de ADNcp en estudios poblacionales. Entre éstas, se cuentan el desarrollo de una batería de *primers* universales que facilitan la amplificación de intrones y espaciadores intergénicos cloroplásticos en un amplio rango de taxones de plantas superiores (Taberlet *et al.*, 1991; Demesure *et al.*, 1995; Dumolin-Lapegue *et al.*, 1997). Inicialmente, la búsqueda de polimorfismos en las regiones amplificadas era realizada mediante la digestión con endonucleasas de restricción.

La obtención de RFLPs a partir de regiones amplificadas por PCR representa una estrategia eficiente en lo referido a tiempo, para la búsqueda de polimorfismos intraespecíficos, ya que sólo se requiere una mínima cantidad de tejido y evita los procedimientos laboriosos experimentales relacionados a la técnica original de RFLP basada en la hibridación por *Southern Blot* (Provan *et al.*, 2001). La técnica PCR-RFLP también pone de manifiesto un mayor número de variaciones en comparación con la técnica original RFLP, ya que al menos el 50% de las variaciones del ADN del cloroplasto se deben a pequeñas inserciones y deleciones (Gielly & Taberlet, 1994).

A partir de la modificación de la técnica original, la variación intraespecífica del ADNcp, revelado por PCR-RFLPs, es cada vez más utilizado en estudios de genética de poblaciones y filogeografía en plantas (El Mousadik & Petit, 1996; Newton *et al.*, 1999; Dutech *et al.*, 2000; Fineschi *et al.*, 2000; Mohanty *et al.*, 2001). La técnica ha sido empleada con éxito para detectar (a veces extensamente) polimorfismos intraespecíficos en numerosas

especies y para proveer información valiosa, particularmente con respecto a la migración de las especies vegetales durante los ciclos glaciales (Petit *et al.*, 1997; Provan *et al.*, 2001).

Esta metodología permitió la identificación de polimorfismos intraespecíficos, inclusive a nivel intrapoblacional como los descritos por Olalde *et al.*, 2002; Shanjani *et al.*, 2003; Schlögl *et al.*, 2007; entre muchos otros. En otras especies, sin embargo, pocos o ningún polimorfismo ha sido detectado, evidenciando la necesidad de metodologías adicionales (Provan *et al.*, 2001).

I.10.1.2 Polimorfismos de longitud en el genoma cloroplástico

Como alternativa al empleo de endonucleasas de restricción para detectar polimorfismos de longitud, se encuentra el significativo hallazgo de repeticiones mono- y dinucleotídicas polimórficas en el genoma cloroplástico (Provan *et al.*, 2001). Powell *et al.* informaron la existencia de niveles importantes de polimorfismos de longitud en *loci* de microsatélites cloroplásticos en especies de *Pinus* (1995a) y *Glycine* (1995b), y estudios posteriores han revelado niveles similares en otras especies (Provan *et al.*, 1999; 2001). Estos microsatélites cloroplásticos o cpSSRs han sido hallados en todos los ADNcp secuenciados hasta la actualidad, así como en cientos de secuencias parciales. La amplificación por PCR de estos SSRs, empleando *primers* complementarios a las regiones 3' y 5' flanqueantes resulta en productos que exhiben variación de longitud correspondiente a la expansión y/o contracción de las regiones repetidas (Provan *et al.*, 2001). La corta longitud y el número limitado de alelos de la mayoría de microsatélites cloroplásticos permiten la confirmación del tamaño de los alelos mediante secuenciación. Esta facilidad representa una ventaja respecto de muchos SSRs nucleares, generalmente multialélicos (y heterocigotas), de los que es mucho más dificultoso obtener secuencias claras (Provan *et al.*, 2001). A diferencia de los microsatélites

en el ADNn, la escasa longitud de estos en el ADNcp permite que se identifiquen a partir de búsquedas en las bases de datos de genomas cloroplásticos ya secuenciados, sin necesidad de utilizar bibliotecas genómicas para tal fin. Luego, los *primers* diseñados para una especie regularmente amplifican en especies relacionadas. De todos modos encontrar verdaderos *primers* universales es difícil, especialmente a nivel intraespecífico (Weising & Gardner, 1999), debido a los requerimientos contrastantes que son condición necesaria en un fragmento de ADN muy corto: sitios conservados en los sitios de hibridación de los *primers* y alta variabilidad en el número de nucleótidos repetidos (Ishii & McCouch, 2000; Provan *et al.*, 2001).

Entre las limitaciones de los cpSSRs se encuentra la posibilidad de subestimar niveles de diferenciación poblacional en aquellos casos en los que la variabilidad dentro de las poblaciones sea muy elevada, incluso en casos en que dos poblaciones distantes no compartan ningún alelo (Hedrick, 1999; Provan *et al.*, 2001).

Este hecho sumado a que no todas las sustituciones de un alelo a otro son igualmente probables y que es incierta la contribución de los procesos de deriva-migración *versus* mutación, lleva a considerar con precaución las distancias genéticas calculadas a partir de cpSSRs. Cuanto más distantes son las unidades estudiadas, mayor es la probabilidad de interpretaciones erróneas, especialmente en estudios filogeográficos a gran escala y de aquellos que analizan relaciones interespecíficas (Provan *et al.*, 2001).

De esta manera, los cpSSRs son buenos indicadores de los posibles efectos de cuellos de botella, efecto fundador y de deriva genética (Vendramin *et al.*, 1998; Provan *et al.*, 2001). Un análisis que combine tanto marcadores nucleares como cloroplásticos permitirá reconstruir

con gran detalle el pasado poblacional y entender la estructura espacial y la dinámica de la diversidad genética de las poblaciones bajo estudio (Hamza, 2010).

La diferencia en la forma de transmisión, y algunas diferencias importantes en patrones de evolución de los genomas nuclear, heredado biparentalmente, y el ADNcp de herencia uniparental, hacen que el análisis de genealogías a través de estos dos tipos de ADN, reflejen diferentes aspectos de la historia y biología de una población (Sunnucks, 2000). En el presente trabajo se muestra por vez primera la caracterización de la diversidad genética de poblaciones más australes de *C. brasiliense* a través del empleo de marcadores RAPDs e ISSRs y establece mediante el análisis de secuencias de genes cloroplásticos relaciones filogeográficas intraespecíficas entre poblaciones argentinas de *Calophyllum brasiliense*, recientemente descritas.



II.Hipótesis y Objetivos

II. Hipótesis y Objetivos

II.1 Hipótesis

Las poblaciones de *C. brasiliense* en estudio pertenecieron a un continuo de selva ribereña en el pasado que atravesó un intenso proceso de fragmentación, provocando la disminución de la variabilidad genética dentro de las mismas y ocasionando su diferenciación genética.

II.2 Objetivos

II.2.1 Objetivo general

Contribuir a la planificación de estrategias para la conservación de las poblaciones argentinas y paraguayas de *Calophyllum brasiliense*.

II.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la estructura genética de las poblaciones de *C. brasiliense* mediante marcadores RAPDs e ISSRs.
- Genotipificar linajes maternos en las poblaciones de *C. brasiliense* mediante la secuenciación de haplotipos cloroplásticos.
- Establecer relaciones filogeográficas de las poblaciones de *C. brasiliense* con otras poblaciones de *Calophyllum sp.* descriptas hasta el momento.



III. Materiales y Métodos

III. Materiales y Métodos

III.1 Sitio de Estudio

Las poblaciones de *C. brasiliense* analizadas en el presente trabajo se encuentran ubicadas en el sur de Paraguay (PY) y el noreste de Argentina (ARG), comprendiendo el extremo sur de distribución de la especie. En cada sitio de muestreo, se gestionaron los permisos tal como lo establecen las autoridades correspondientes y/o los propietarios en el caso de reservas privadas, para acceder a las poblaciones y efectuar la recolección de hojas y otras actividades mencionadas más adelante. Además de estas poblaciones argentinas y paraguayas, fue posible incorporar en el análisis individuos procedentes de una población mexicana (MX), representando ejemplares del extremo norte de la distribución (Figura 5). En este caso, los ejemplares fueron gentilmente colectados por Guillermo Huerta-Ramos (Instituto de Ecología A. C. Herbario XAL) y transportados por el Lic. Leonardo Amarilla durante sus campañas de colección.

Las poblaciones argentinas se localizan en el noreste de Corrientes y sudoeste de Misiones. Las coordenadas geográficas de cada una se detallan en la Tabla I. La población de San Ignacio (SI) se encuentra localizada en un fragmento de selva ribereña en Puerto Nuevo, San Ignacio, Misiones, sitio ubicado a 60 km al N de la ciudad de Posadas, a orillas del río Paraná. Mientras que la población estudiada en la provincia de Corrientes, se encuentra emplazada en el Refugio Rincón Ombú (RO) en un fragmento de selva de Ituzaingó, a aproximadamente 40 km al S de la ciudad de Posadas y separadas entre sí por 100 km (Figura 5). La región se corresponde con la región fitogeográfica conocida como Provincia Paranaense (Cabrera, 1976), ubicada en la unión de los distritos Fluvial, del Urunday y de los Laureles (Martínez-Crovetto, 1963). El clima es subtropical sin estación seca. Las

precipitaciones en la zona son de aproximadamente 1.700 mm anuales, y el promedio anual de temperatura es 21° C (Biganzoli & Múlgura, 2004).

A diferencia de las poblaciones anteriores, la población con localización en Puerto Valle (PV, Ituzaingó – Corrientes) se encuentra emplazada en la margen norte de los Esteros del Iberá, dentro del predio forestal perteneciente a la empresa maderera Pomera. El remanente de selva inundable en el que se encuentra esta población representa uno de un conjunto de pequeños fragmentos de selvas dispersos en los límites del sistema de esteros en el ambiente de campo, alternados con plantaciones forestales de pino y eucaliptus.

La población de Ayolas pertenece a la margen derecha del río Paraná a la altura de la ciudad de Ayolas, también ubicada en zonas bajas e inundables del Departamento de Misiones (PY). Por su parte, la población de la isla Yacyretá se encuentra en la reserva compensatoria creada por la Entidad Binacional Yacyretá para preservar los remanentes de selva isleña, luego de que el embalse de la represa causara la pérdida de gran parte de la región oriental de esta isla, y de otras aledañas, como por ejemplo la Isla Talavera (ARG).

Tabla I. Localización geográfica y números de individuos colectados en las poblaciones analizadas. **ARG:** Argentina. **PY:** Paraguay. **MX:** México. **N:** Tamaño de la muestra.

Población	Localización	Coordenadas geográficas	N
Puerto Nuevo	San Ignacio (Misiones - ARG)	27°16'34,4"S - 55°34'11,9"O	31
Rincón Ombú	Ituzaingó (Corrientes - ARG)	27°24'54,42"S - 56°29'43"O	30
Puerto Valle	Ituzaingó (Corrientes - ARG)	27°35'23,84"S - 56°31'34,17"O	15
Reserva Isla Yacyretá	Depto. Misiones (PY)	27°24'53,88"S - 56°45'21,25"O	3
Ayolas	Misiones (Misiones - PY)	27°24'6,48"S - 56°51'17,75"O	2
Parque Jaguaroundi	Coatzacoalcos (Veracruz - MX)	18°7'20,27"N – 94°21'45,15"O	6



Figura 5. Localización de las poblaciones de *C. brasiliense* estudiadas. **Arriba derecha:** distribución de la especie resaltando la localización de las poblaciones analizadas (recuadros). **Arriba izquierda:** ubicación de la población de México. **Abajo:** se destaca en rojo la ubicación de las poblaciones argentinas y paraguayas. La línea amarilla muestra los límites internacionales.

III.2 Material biológico

El tejido vegetal de elección para realizar la extracción de ADN es aquel que presenta actividad constante de desarrollo o se encuentra en continua división celular (Doyle & Doyle, 1990), por cuanto se recolectaron de 3 a 10 (dependiendo de su tamaño) hojas jóvenes de individuos al azar. Cada individuo se identificó con un número grabado en chapa metálica que se colocó en la corteza.

En las poblaciones de SI, RO y PV, y actuando conjuntamente con el grupo de investigadores que evalúa otros aspectos (*e.g.* fitosociológicos, fitoquímicos y fenológicos) en estas poblaciones y comunidades, se delimitó el área de trabajo. De esta manera, se trazaron parcelas en cada localidad, subdividiéndolas en cuadrantes de 10 x 10 m, en los que se censaron todos los individuos, seleccionando algunos de ellos para la toma de muestras para los estudios genéticos. El tamaño de la parcela total en cada sitio dependió de la extensión de los remanentes de selva, en SI fue de 2.100 m² mientras que en RO fue de 900 m².

Las hojas seleccionadas a partir de cada individuo se dispusieron en bolsas con cierre hermético debidamente rotuladas e identificadas (aclarando: n° de individuo, fecha y población) acondicionadas con sílica gel como medio de secado (Chase & Hills, 1991). En los casos en que se observó exceso de humedad se procedió a recambios de la sílica hasta que el material quedara seco completamente.

El tamaño muestral (*N*) de cada población se detalla en la Tabla I. El número de individuos muestreados dependió del tamaño de las poblaciones estudiadas y las condiciones o posibilidades de muestreo en las mismas. A efectos de seleccionar los individuos se consideraron los siguientes criterios fijados *a priori*: (a) individuos mayores a 1 m de altura, (b) separados a una distancia mínima de 10 m entre sí (Pither *et al.*, 2003). Cuando el número

de subparcelas trazadas para el censo de todos los individuos no fue suficiente para cumplimentar con el segundo criterio, se extendieron transectas a partir de la grilla de parcelas. Con este método de referencia, se ubicaron en el espacio y se colectaron hojas de los individuos faltantes para completar el número de muestras requeridas (Figura 6). Las muestras fueron mantenidas en las bolsas herméticas con sílica hasta el momento de la extracción.

En el laboratorio se realizó la molienda de las hojas con nitrógeno líquido, excluyendo las nervaduras principales. El polvo obtenido fue transvasado a tubos plásticos de polipropileno de 2,0 ml debidamente rotulados para la inmediata extracción de ADN genómico total.

III.3 Extracción de ADN a partir de tejido foliar

El procedimiento de extracción de ADN genómico total se realizó según el protocolo de Stange *et al.*, 1998, modificado por Percuoco (2007) para *C. brasiliense*, siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

1. A las hojas molidas (120-10 mg) se le agregó 1 ml de solución de extracción (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris HCl pH 8.0; 2% P/V de PVP40; 5 mM de ácido ascórbico; 4 mM de DIECA y 1,2% de β -mercaptoetanol) a 60 °C. Los últimos cuatro componentes fueron añadidos al buffer citado en el protocolo original y corresponden a sustancias de naturaleza reductora, por lo que se esperó que previniesen la oxidación de polifenoles y polisacáridos, evitando así que establezcan uniones con el ADN y fueran aislados con éste. Se invirtió varias veces para mezclar (15 s) e incubar a 60 °C por espacio de 3 h, en lugar de los 30 min sugeridos por Stange *et al.* (1998),

dado que permitió la obtención de extracciones de mayor calidad. Se realizaron inversiones cada 20 min para favorecer la reacción de extracción.

2. Se llevó a volumen 2,0 ml con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión para obtener una emulsión (se agitó vigorosamente por 5 min dependiendo del material).
3. Se centrifugó a 1100g por 5 min.
4. La fase acuosa superior fue trasvasada con pipeta, a un tubo de 1,5 ml. Los pasos de extracción orgánica se repitieron dos veces para clarificar la fase acuosa.
5. Se agregaron 2/3 de isopropanol frío (-20 °C) mezclando por inversión y se colocó en freezer por 60 min para favorecer la precipitación del ADN. El tiempo de incubación establecido por Stange *et al.* (1998) fue duplicado para favorecer la precipitación del ADN.
6. Seguidamente se centrifugó a 1100g por 20 min. Se descartó con mucho cuidado el isopropanol, y se lavó el *pellet* con etanol 70 %. A continuación, se dejó secar el mismo a temperatura ambiente por 12 h o en estufa a 37 °C hasta su secado completo (aprox. 20 min).
7. Finalmente el ADN fue resuspendido en 30 µl de Tris-HCl 10 mM pH. 7,5 y se lo conservó a 4 °C, hasta el momento de su utilización.

III.3.1 Criterios de pureza, integridad y semicuantificación del ADN extraído

Para evaluar el rendimiento del protocolo de extracción empleado se determinó el nivel de pureza e integridad del ADN mediante electroforesis de prueba en geles o minigeles de agarosa al 1% en buffer TBE (45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA) al 0,5 X con bromuro de



Figura 6. Trabajo en las parcelas. **a.** Identificación de individuos con chapa metálica. **b y c.** Delimitación de subparcelas con cinta plástica. **d.** Acondicionamiento de las hojas seleccionadas para los estudios genéticos posteriores.

etidio (BrEt) o *GelRed* (Biotium). Se sembraron aproximadamente 2 μ l de la solución de ADN, prolongándose la electroforesis por espacio de 1 h a 5 V/cm. Se utilizó 1 Kb DNA *ladder* (Bio-Lógicos) como marcador de referencia. La visualización del ADN se llevó a cabo por fluorescencia, excitando los geles por transiluminación con luz ultravioleta (λ 302 nm) UVP-TM-20 (Upland, CA). Los geles se fotodocumentaron con cámara Kodak Easy Share B102-1, empleando lente *close up* y filtros para UV y BrEt cuando fue necesario.

La concentración del ADN se estimó mediante semicuantificación en geles de agarosa utilizando marcadores de peso y masa molecular conocidos (λ de Promega, *Mass Ruler DNA ladder Mix* de Fermentas). El análisis visual a UV proporcionó información relativa a concentraciones (en ng/ μ l) y calidad de ADN extraído. En la Figura 7 se puede apreciar la calidad del ADN genómico total obtenido a partir de algunos individuos provenientes de las distintas poblaciones analizadas en el presente trabajo. Se observaron diferencias en los rendimientos obtenidos para cada muestra. Teniendo en cuenta el marcador de masa utilizado, la concentración de ADN se estimó entre 10 y 50 ng/ μ l. Los individuos que exhibieron menor rendimiento (>10 ng), igualmente fueron sometidos a amplificación de las regiones de interés.

Seguidamente se procedió a realizar las diluciones respectivas de cada uno de las muestras a fin de obtener una concentración de trabajo de aproximadamente 10 ng/ μ l. Las muestras de ADN así preparadas se preservaron en heladera hasta el momento de su utilización.

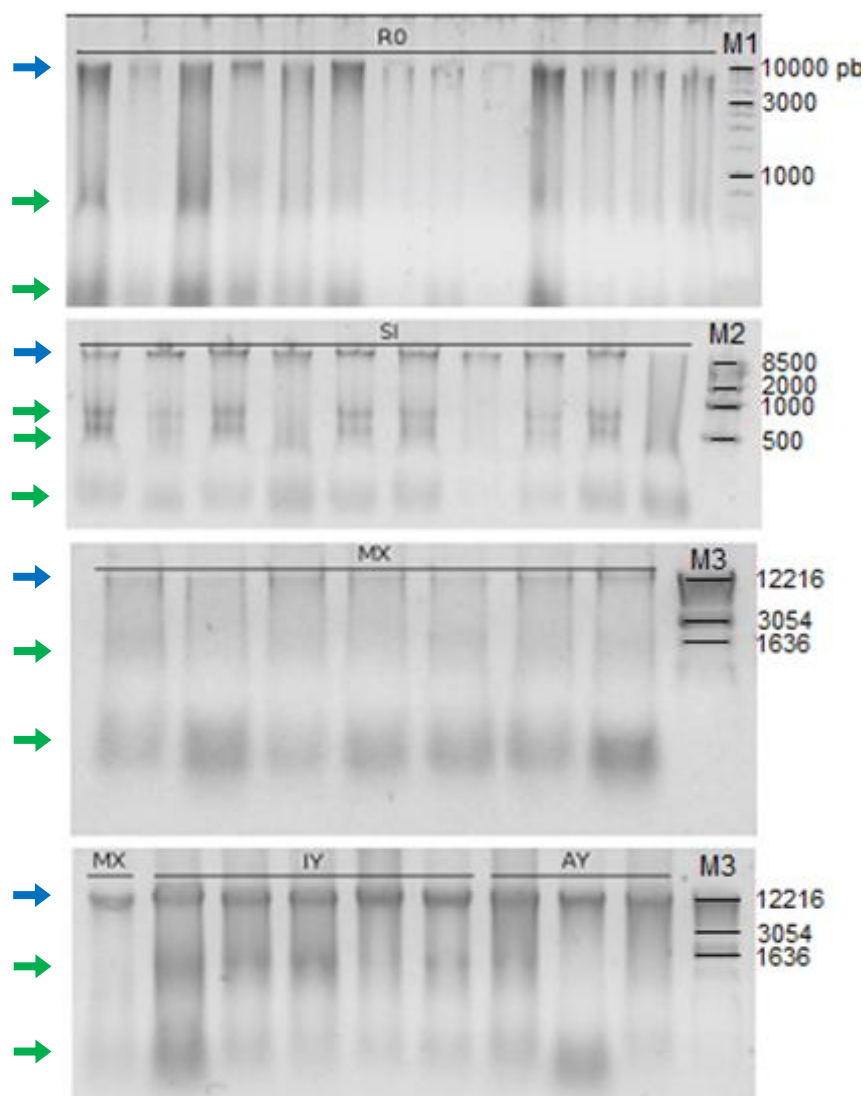


Figura 7. Verificación de extracción de ADN genómico total a partir de individuos procedentes de las diferentes poblaciones analizadas en el presente trabajo: **RO:** Rincón Ombú, **SI:** San Ignacio, **IY:** Isla Yacyretá, **AY:** Ayolas, **MX:** México. **M1:** 1 kb *Ladder* de Promega; **M2:** 500 pb *Ladder* de Invitrogen; **M3:** 1 kb *Ladder* de Invitrogen. **Flechas azules:** banda de ADN. **Flechas verdes:** ARN.

III.4 Obtención de marcadores moleculares nucleares y citoplasmáticos

III.4.1 Marcadores genéticos dominantes en el genoma nuclear de *C. brasiliense*

Las poblaciones de *C. brasiliense*, emplazadas en las localidades de San Ignacio (SI) y Rincón Ombú (RO) fueron las primeras en ser identificadas. De ambas poblaciones, se cuenta con un número adecuado de muestras, pertenecientes a treinta árboles jóvenes ($N=30$) procedentes de ambos sitios. El total de 60 muestras, conjuntamente con su registro espacial permitió la realización de una evaluación genético-espacial adecuada de SI y RO. Por este motivo, la caracterización de la variabilidad genética mediante RAPDs se realizó en estas poblaciones mientras que los restantes remanentes de poblaciones fueron integrados en un análisis filogeográfico. Estas poblaciones fueron descritas con posterioridad y se tratan de fragmentos de selva ribereña particularmente afectados por la suba de cota de la represa Yacyretá a principios del año 2012.

III.4.1.1 Amplificación al azar de polimorfismos de ADN nuclear: RAPDs (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*)

En amplificaciones de rutina se consiguen amplificar secuencias de ADN que en general resultan conocidas. Así, una vez seleccionadas las secuencias de interés se diseñan los *primers* que hibriden en las regiones flanqueantes a esa secuencia. Luego, a través de la reacción en cadena de la polimerasa se amplifican específicamente los segmentos de ADN que fueron delimitados por el par de *primers* seleccionados. En el caso de marcadores RAPDs las secuencias diana o *target* que se desean analizar son desconocidas. Por ello, es necesario utilizar *primers* de secuencia arbitraria, con las características que fueron detalladas en el ítem I.9.1 de la Introducción. Así, la amplificación de regiones aleatorias en el ADN molde se

obtiene una vez que los *primers* hibridan en el ADN a una temperatura (o T_m) de baja astringencia.

En el presente trabajo se escogieron cebadores comerciales de la firma *Biodynamics* Serie A (B050-10) y Serie B (B051-10), los que se detallan en la Tabla II. Se ensayó un rango de temperatura recomendado por la firma que osciló entre 36-40 °C. Todos los ensayos fueron realizados al menos dos veces para asegurar su reproducibilidad, incorporándose controles negativos que correspondieron a la mezcla de reacción sin el agregado de templado de ADN. En el caso de perfiles no reproducibles el criterio fue desestimar el uso del *primer*. La reacción de amplificación fue efectuada en un termociclador Techne PHC-3. La mezcla y volumen de reacción se especifica en la Tabla III. Asimismo, el perfil de ciclado optimizado consistió en la ejecución de 40 iteraciones compuestas por una desnaturalización a 94 °C por 1 min, una hibridación a 35 °C por 1 min y una elongación a 72 °C por 2 min. Finalmente los tubos fueron mantenidos a 4 °C (Tabla IV). Posteriormente, los productos de amplificación fueron verificados por medio de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,4 % en buffer TBE 0,5 X por espacio de 2 – 3 h a un voltaje de 3 V/cm, y teñidos con BrEt (0,5 µg/ml), el cual fue adicionado previamente al gel (Sambrook *et al.*, 1989). El marcador de peso molecular seleccionado en esta oportunidad fue una escalera de 100 pb (PB-L Productos Biológicos® READY-TO USE). A continuación los geles fueron visualizados y fotografiados como se describió anteriormente en III.3.1 de la presente sección.

Tabla II. Detalle de la secuencia de *primers* utilizados para la obtención de perfiles RAPDs correspondientes a las series A y B de Biodynamics (5'→3').

Nombre	Secuencia 5'→3'	Nombre	Secuencia 5'→3'
A01	CCCAAGGTC	B01	TCGAAGTCCT
A02	GGTGCGGGAA	B02	CGATGTCAGA
A03	AAGACCCCTC	B03	ACTTCGACAA
A04	CTTCACCCGA	B04	TGCCATCAGT
A05	CACCAGGTGA	B05	GCGCTCACGC
A06	GAGTCTCAGG	B06	GTGACATGCC
A07	CCCGATTCTGG	B07	AGATCGAGCC
A08	ACGCACAACC	B08	TCACCACGGT
A09	CTAATGCCGT	B09	ATGGCTCAGC
A10	ACGGCGTATG	B10	CAGGCACTAG

Tabla III. Composición de la mezcla de reacción de PCR.

Componente (Concentración inicial)	Concentración Final
Buffer <i>Taq</i> NH ₄ (SO ₄) ₂ (5 X)	1 X
BSA (10 mg/ml)	1 µg/ul
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM
dNTPs (2 mM)	0,1 mM
<i>Primer</i> (0,75 µg/µl)	3µg/µl
<i>Taq</i> (5 U/µl) ^(a)	1,5 U
ADN (38 ng/µl)	1/50
Agua UP ^(b) c.s.p. ^(c)	40 µl

^(a): *Go Taq Flexi* (Promega)

^(b): UP: Ultrapura

^(c): c.s.p.: cantidad suficiente para

Tabla IV. Perfil de ciclado para la obtención de RAPDs.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización	94	1
<i>Annealing</i>	35	1
Extensión	72	2
N° de ciclos	40	
<i>Hold final</i>	4	∞

III.4.1.2 Amplificación al azar de polimorfismos de ADN nuclear: ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Los marcadores ISSRs tienen carácter dominante, por lo que el fundamento de la técnica y análisis posterior es similar al de los RAPDs. La diferencia entre ambos es que los *primers* empleados para la obtención de los ISSRs contienen *n* repeticiones de microsatélites dispersos en el genoma nuclear, acompañados de otras bases que sirven de anclaje para que el cebador permita la amplificación de los fragmentos inter-micorsatélite (Zietkiewicks *et al.*, 1994).

Se ensayaron 33 *primers* de la firma UBC (University of British Columbia), cuyas secuencias se encuentran detalladas en la Tabla V. La mezcla de reacción optimizada se resume en la Tabla VI. Teniendo en cuenta la temperatura de *annealing* de los *primers*, se ensayaron y ajustaron dos perfiles de amplificación, ambos especificados en las Tablas VII y VIII.

Tabla V. Detalle de la secuencia de primers ISSRs utilizados*.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Nombre	Secuencia 5'→3'
801	ATA TAT ATA TAT ATA TT	844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	850	GTG TGT GTG TGT GTG TYC
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG
813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
814	CTC TCT CTC TCT CTC TA	856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA
816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG
822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	873	GAC AGA CAG ACA GAC A
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	880	GGA GAG GAG AGG AGA
835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	881	GGG TGG GGT GGG GTG
836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	886	VDV CTC TCT CTC TCT CT
840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	889	DBD ACA CAC ACA CAC AC
841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	890	VHV GTG TGT GTG TGT GT
842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	891	HVH TGT GTG TGT GTG TG

* Código abreviado de letras: Y = C, TR = A, GB = C, G, TD = A, G, TH = A, C, TV = A,C, G

Tabla VI. Composición de la mezcla de reacción para la amplificación de ISSRs.

Componente (Concentración inicial)	Concentración Final
Buffer <i>Taq</i> NH ₄ (SO ₄) ₂ (10 X)	1 X
BSA (10 mg/ml)	1 µg/ul
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM
dNTPs (2 mM)	0,2 mM
<i>Primer</i> (0,75 µg/µl)	160 µM
<i>Taq</i> (5 U/µl) ^(*)	1 U
ADN (38 ng/µl)	1/50
Agua UP c.s.p.	25 µl

(*) Fermentas

Tabla VII. Perfil de amplificación 1 para la obtención de marcadores ISSRs.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	5 min
Desnaturalización	94	30 s
<i>Annealing</i>	50-57 ^(*)	45 s
Extensión	72	2 min
Ciclos	12	
Desnaturalización	94	30 s
<i>Annealing</i>	45-52 ^(*)	45 s
Extensión	72	2 min
Ciclos	30	
Extensión final	72	5 min
Hold final	4	∞

(*) Temperaturas modificadas simultáneamente para obtener una diferencia de 5 °C entre ambas

Tabla VIII. Perfil de amplificación 2 para la obtención de marcadores ISSRs.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	94	30 s
<i>Annealing</i>	50	30 s
Extensión	72	2 min
Ciclos	35	
Extensión final	72	10 min
Hold final	4	∞

III.4.1.3 Análisis de perfiles RAPDs e ISSRs en el genoma nuclear de *C. brasiliense*

Teniendo en cuenta que las moléculas de ADN lineal migran a través de la matriz del gel a velocidades que son inversamente proporcionales al \log_{10} del número de pares de bases que las conforman (Sambrook *et al.*, 1989), se utilizó como referencia el marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder* (PB-L Productos Biológicos®) para estimar el tamaño de los amplicones a través del programa GQmol³ (Schuster & Cruz, 2004). Cuando los controles negativos exhibieron bandas y éstas a su vez coincidían con algunas de las observadas en los perfiles de los individuos analizados, las mismas fueron restadas del análisis (Thormann *et al.*, 1994; Casas *et al.*, 1999). Para la evaluación genética de la población se siguieron los supuestos de Lynch & Milligan (1994) a saber: (a) la interpretación de los patrones de bandas en los geles de agarosa puede hacerse de manera completamente inequívoca, es decir, los alelos marcadores de diferentes *loci* no comigran en la misma posición del gel; (b) cada *locus* se trata como un sistema de dos alelos, siendo amplificable un único alelo por *locus*; y (c) las

³ <http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>

poblaciones bajo estudio son diploides de reproducción sexual. Por cuanto, una vez estimado el tamaño de los fragmentos se generó una matriz binaria de datos indicando presencia (1) y ausencia (0) de los fragmentos obtenidos en cada uno de los individuos analizados. Posteriormente, dicha matriz fue utilizada para la estimación de los siguientes parámetros genético-poblacionales por medio del programa informático GeneAIEx v.6.5⁴ (Peakall & Smouse, 2006; 2012) de uso corriente en genética de poblaciones en modelos vegetales, a saber:

- a) **Frecuencias alélicas** (Lynch & Milligan 1994): a partir de marcadores dominantes binarios no fue posible calcular directamente las frecuencias alélicas como normalmente se estiman cuando se utilizan marcadores codominantes. Sin embargo, se asumió alogamia completa (mayoría de los animales y algunas plantas) para estimarlas. La interpretación de las bandas se realizó de la siguiente manera:

(1)Presencia de banda: representa ambos genotipos **AA** o **Aa**

(0)Ausencia: representa al genotipo **aa**

por lo cual la frecuencia del genotipo **aa** se estimó como:

$$q^2 = \text{frecuencia}_{(\text{ausencia de la banda})} = 1 - \text{frecuencia}_{(\text{presencia de banda})}$$

entonces,

$$q = \sqrt{\text{frecuencia}_{(\text{ausencia de banda})}}$$

a partir de q fue posible estimar p como:

$$p = 1 - q$$

⁴<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAIEx/>

- b) Porcentaje de *loci* polimórficos (P):** el valor de P corresponde al porcentaje de *loci* polimórficos con respecto al número total de *loci*. Un *locus* fue calificado como polimórfico si la banda considerada se encontraba presente en uno o más, pero no todos, los individuos estudiados de la población. Consecuentemente, un *locus* fue considerado como monomórfico, únicamente cuando fue observado en todos los individuos analizados.
- c) Número de alelos diferentes (n_a):** el número de alelos fue determinado por conteo directo de los alelos de 1 hasta n , donde n es el tamaño muestral. El programa GenAlEx estima este valor para cada *locus*, pero también provee la media aritmética para todos los *loci*.
- d) Número efectivo de alelos (n_e)** (Kimura & Crow, 1964): representa una estimación del número de alelos igualmente frecuente en una población ideal con una homocigosidad equivalente a la población actual (Hartl & Clark, 1997). Presenta valores de 1 a n alelos, fue calculado para cada *locus* y se estimó la media de todos los *loci*, como:

$$n_e = \frac{1}{1 - H_e}$$

donde H_e corresponde a la heterocigosidad esperada.

- e) Índice de Shannon (I)** (Brown & Wier, 1983): este índice fue calculado en base a cada *locus*. Asimismo, se obtuvo una media aritmética poblacional a partir de todos los *loci*. Este índice es equivalente al Índice de ecología de Shannon-Weaver. El índice de Shannon toma valores entre 0 e ∞ y es una medida de la diversidad alélica, tal como lo es

la Heterocigosidad Esperada (H_e). Cuanto mayor es el valor, más diversidad alélica existe en la población analizada. Este índice puede representarse como:

$$I = \sum p_i \ln p_i$$

donde p_i representa las frecuencias alélicas estimadas del alelo i -ésimo (Peakall & Smouse, 2006).

f) Heterocigosidad esperada (H_e): (Nei, 1973) este parámetro es calculado una vez que las frecuencias alélicas han sido estimadas a partir de los datos binarios, siguiendo la siguiente fórmula y representa la diversidad alélica o génica:

$$H_e = \frac{2n}{2n-1} \left(1 - \sum p_i^2 \right)$$

g) Distancia genética de Nei ($NeiD$): es una medida del grado de diferenciación genética entre las poblaciones, similar al parámetro F_{ST} . Sin embargo, no requiere que se cumpla el supuesto de equilibrio de Hardy-Weinberg, ya que su cálculo se basa en las frecuencias génicas de cada alelo en una y otra población, expresado como:

$$NeiD = -\ln(I)$$

donde

$$I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}} J_{xy} = \sum_{i=1}^k p_{ix} p_{iy}$$

$$J_x = \sum_{i=1}^k p_{ix}^2 J_x = \sum_{i=1}^k p_{iy}^2$$

El parámetro I se conoce como Identidad de Nei, siendo p_{ix} y p_{iy} las frecuencias del alelo i -ésimo en las poblaciones x e y respectivamente.

- h) Distancia Genética (D):** a diferencia de la distancia genética de Nei, esta matriz se utiliza luego para el Análisis de Componentes Principales (PCoA), test de Mantel y Autocorrelación espacial. Esta medida de distancia también puede emplearse para calcular Φ_{PT} por AMOVA, como una estimación de la diferenciación genética poblacional a partir de información binaria, análogo al F_{ST} . La distancia genética entre dos individuos con múltiples *loci* informados equivale a la suma de los diferentes estados entre ambos perfiles de ADN. En el caso de datos binarios, si hay coincidencia de estado para un *locus* el valor será igual a 0, si son distintos estados, entonces suma 1 unidad de distancia. De esta forma, se generó una matriz de distancia entre todos los pares de individuos ($N \times N=61 \times 61$) con todas las distancias calculadas como:

$$D = n \left(1 - \frac{2n_{xy}}{2n} \right)$$

donde n_{xy} es el n° de caracteres compartidos y n el número total de loci.

- i) Análisis Molecular de la Variancia (AMOVA):** el Análisis Molecular de la Variancia es uno de los procedimientos estadísticos basados en la distancia genética que permiten analizar la distribución de la variabilidad genética entre poblaciones así como la

estimación de los estadísticos F y sus análogos, Φ_{PT} y R_{ST} . Para efectuar el análisis se definieron:

Hipótesis Nula (H_0): las entidades poblacionales analizadas corresponden a una única población en la que la reproducción de nuevos individuos es completamente al azar. No existe diferenciación genética entre las poblaciones ($\Phi_{PT} = 0$).

Hipótesis Alternativa (H_A): Existe algún grado de diferenciación genética entre las poblaciones ($\Phi_{PT} > 0$).

Para el cálculo de Φ_{PT} vía AMOVA se parte del cálculo de la variancia:

$$S^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}$$

del que se obtiene el desvío estándar:

$$S = \sqrt{S^2} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Para el AMOVA, la suma de cuadrados total (SC) y la media de cuadrados (MC) se calcula a partir de la matriz de distancia, como:

$$SC_{TOT} = \frac{\sum d_{ij}^2}{2N}$$

$$SC_{DP_n} = \frac{\sum d_{ij}^2}{2n_1}$$

$$SC_{DP} = SC_{DP_1} + SC_{DP_2} \dots SC_{DP_n} \quad SC_{EP} = SC_{TOT} - SC_{DP}$$

$$MC_{DP} = \frac{SC_{DP}}{gl_{DP}} \quad MC_{EP} = \frac{SC_{EP}}{gl_{EP}}$$

donde d_{ij}^2 es el cuadrado de la distancia genética entre los individuos i-ésimo y j-ésimo.

La estimación de la variancia está dada por la expresión:

$$V_{EP} = \frac{MC_{EP} - MC_{DP}}{N0}$$

$$V_{DP} = MC_{DP}$$

$$N0 = \frac{1}{(N_p - 1)} \left(\sum_{k=1}^{N_p} np_k - \left(\frac{\sum_{k=1}^{N_p} np_k^2}{\sum_{k=1}^{N_p} np_k} \right) \right)$$

A partir de estas variancias, se estima:

$$\varphi_{PT} = \frac{V_{EP}}{V_{EP} + V_{DP}}$$

Donde V_{EP} =Variancia entre poblaciones;
 V_{DP} =Variancia dentro de las poblaciones;
 N =Número de muestras; N_p =Número de poblaciones con k poblaciones; n_k =Número de muestras en las k poblaciones; gl_{EP} = $N_p - 1$, grados de libertad entre poblaciones; gl_{DP} = $N - N_p$, grados de libertad dentro de las poblaciones.

Para evaluar la significancia del valor del estadístico Φ_{PT} se realizaron 999 permutaciones con $p=0,001$.

j) Análisis de Componentes Principales (PCoA): las matrices de distancia que contienen muchas entradas suelen ser difíciles de interpretar. Uno de los modos de visualizar en forma gráfica la información más relevante está dado por el análisis de Componentes Principales (PCoA). Este procedimiento destaca los patrones esenciales de los datos en estudio, sin alterar los datos en sí mismos. Es una técnica de análisis multivariado que permite identificar y graficar los agrupamientos o *clusters* principales a partir de datos múltiples (*e.g.*, múltiples *loci* e individuos) mediante un complejo desarrollo matemático. En síntesis, consiste en ubicar los mayores ejes de variación dentro de los datos multidimensionales. Cada eje agregado corresponde a una proporción de la variación total, por lo que las 2 o 3 primeras dimensiones o ejes explican la mayor parte de la variabilidad entre los grupos (Peakall & Smouse, 2006; 2012). Otros algoritmos utilizados para efectuar los agrupamientos son los métodos de construcción de árboles filogenéticos, tales como UPGMA o *Neighbour Joining*. Sin embargo, asumen de antemano la existencia de estructura genética jerárquica, supuesto no necesariamente verdadero a nivel poblacional. Otra desventaja es la cantidad de individuos analizados, lo que también dificulta la interpretación. Por su parte, a diferencia de los métodos filogenéticos, el PCoA carece de test estadísticos para comprobar los agrupamientos y no ofrece la posibilidad de efectuar *bootstrapping* (Peakall & Smouse, 2006; 2012).

k) Test de Mantel: el test de Mantel (Mantel, 1967) permite comprobar si los elementos de dos matrices con entradas coincidentes están correlacionados, es decir, evalúa la correspondencia de matrices. Esta herramienta estadística fue utilizada para comparar las

matrices de distancia genética (calculada en el ítem **h**) y la matriz de distancia geográfica.

Ésta última tiene 61 x 61 elementos y responde a la expresión:

$$D = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2}$$

donde x_i e y_i son las coordenadas de la muestra i y x_j e y_j lo son de la muestra j .

El test arroja un valor de correlación R_{xy} calculado como:

$$SS_x = \sum_{i \neq j}^N (x_{ij} - \bar{x})^2$$

$$SS_y = \sum_{i \neq j}^N (y_{ij} - \bar{y})^2$$

$$SP_{xy} = \sum_{i \neq j}^N (x_{ij} - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y})$$

$$R_{xy} = \frac{SP_{xy}}{\sqrt{SS_x SS_y}}$$

donde SP_{xy} es la suma de los productos cruzados de los elementos de las matrices X e Y . SS_x es la suma de los productos de los elementos de X y SS_y es la suma de los elementos de Y (Smouse et al., 1986; Smouse & Long, 1992).

Las hipótesis testeadas fueron:

H_0 : no existe correlación entre los elementos de las matrices X e Y ($R_{xy}=0$).

H_A : Existe correlación entre los elementos de X e Y ($R_{xy}\neq 0$).

Para la aceptación o rechazo de estas hipótesis se asumió la distribución al azar de los genotipos y se obtuvieron valores R_{xy} a partir de 9.999 permutaciones al azar de los genotipos en el espacio. Se calcularon los intervalos de confianza para $p=0,05$ y se compararon con el valor R_{xy} de la muestra original.

I) Autocorrelación Espacial: la autocorrelación espacial es una herramienta extensamente utilizada para explorar las relaciones entre variables ecológicas o genéticas y la localización geográfica. Esta metodología de análisis intenta describir la estructura genética en cada sitio de estudio, para ello se generaron las matrices de distancia genética y geográfica para SI (31 x 31) y RO (30 x 30) en forma separada. Se ensayaron los métodos desarrollados por Smouse & Peakall (1999) posteriormente ampliados por Peakall (2003), Double *et al.* (2005) y Smouse *et al.* (2008). A diferencia de los análisis clásicos, que analizan alelo por alelo, *locus* por *locus*, la base de este procedimiento es multivariada. La combinación de todos los *loci* intensifica la “señal espacial”, al reducir el factor estocástico (dado por alelo-alelo, *locus-locus*). El parámetro calculado es el coeficiente de correlación (r) que toma valores dentro del intervalo $[-1, +1]$, y guarda estrecha relación con el índice I de Morán. El valor representa la medida de similitud genética entre pares de individuos comprendidos dentro de una clase de distancia previamente definida, en este trabajo de 10 metros. Los resultados de la autocorrelación

se expresan en forma gráfica en correlogramas. Para la interpretación del análisis se establecieron las siguientes hipótesis:

H_0 : los genotipos se distribuyen al azar en el espacio. No existe estructuración espacial ($r = 0$).

H_A : La distribución de los genotipos no es al azar en el espacio sino que existe algún grado de estructuración genética espacial ($r \neq 0$).

Para la aceptación o rechazo de estas hipótesis se siguieron dos métodos:

1. Permutaciones: se asumió la distribución al azar de los genotipos y se obtuvieron valores r a partir de 9.999 rearreglos al azar de los genotipos en el espacio. Se calcularon los intervalos de confianza para $p=0,05$ y se compararon con el valor r de la muestra original.

2. Bootstrap: se efectuaron 10.000 remuestreos con reemplazos en cada clase de distancia, para definir el intervalo de confianza con $p=0,05$ de cada valor r calculado a partir de los datos originales.

III.4.2 Marcadores genéticos codominantes en el genoma nuclear de *C. brasiliense*

La transferencia de marcadores SSRs entre especies de plantas ha sido verificada en algunos casos, usualmente entre especies dentro de géneros e inclusive entre géneros cercanos (Hale, 2005). Teniendo en cuenta que para *C. brasiliense* no existen en la literatura datos de marcadores codominantes nucleares, en el presente trabajo, la elección de cebadores se realizó a partir de los descritos en la literatura, seleccionando aquellos que hayan sido utilizados satisfactoriamente en familias relacionadas con *C. brasiliense* y en estudios de amplificación

cruzada, que además hayan mostrado elevado polimorfismo (Néri, 2011; Hale *et al.*, 2002; 2004; 2005).

Se ensayaron perfiles de amplificación de regiones que contienen microsatélites en el genoma nuclear, utilizando *primers* diseñados para especies de la familia Clusiaceae: pares clone10, cln8 y clm1 (Qosim *et al.*, 2011; Hale *et al.*, 2002). Las características de los *primers* utilizados (IDT®) se especifican en la Tabla IX. Los ensayos de PCR fueron realizados en un termociclador PERKIN ELMER GeneAmp System 9600 (*Applied Biosystems*) e inicialmente se tuvieron en cuenta las condiciones de ciclado sugeridas en la literatura (Tabla X). Todas las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen final de 25 µl, y respetando las concentraciones de los reactivos que se detallan en la Tabla XI. En todos los ensayos se incorporaron controles negativos de reacción. Los amplicones fueron verificados mediante electroforesis (5 V/cm) en geles de agarosa al 2% en TBE al 0,5 X, teñidos con BrEt (0,5 µg/ml) o GelRed (1:10.000); (Sambrook *et al.*, 1989). Los geles fueron revelados y fotodocumentados tal como se detalló previamente. El marcador de peso molecular seleccionado como referencia fue 100 pb *DNA Ladder* (Solis Biodyne y/o Productos Bio-Lógicos).

Tabla IX. Detalle de las secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación de los diferentes *loci* microsatélites nucleares seleccionados para el análisis.

Nombre	Secuencia (5'-->3')	Motivo	Referencia	Tamaño esperado ^(*)
Clm1	TCC AAA GGT ATG CAT CAG AGG GCA GAA ACA TGC ACT CAC AAA	(TC) ₂₈	Hale <i>et al.</i> , 2002	166-262 pb (<i>Clusia minor</i>)
Cln8	ATT TCC CGG AAG TTC ATG A CAC CAC CGT GTA AGG GTT TT	(AG) ₁₁		175-233 pb (<i>Clusia numerosa</i>)
Clone 10	GTG TTT CCA TTT GTT ACG CGC T TAA TGC CGT TGG GCA GTG A	(AC) ₆ (AG) ₅	Qosim <i>et al.</i> , 2011	342 pb (<i>Garcinia mangostana</i>)

^(*) Se indica la/s especie/s en la/s que fue ensayado

Tabla X. Detalle de las condiciones de ciclado sugeridas por Hale *et al.* (2002). **T:** Temperatura (°C). **t:** tiempo.

Etapas	SSR nucleares			
	Cln1		Cln8	
	T	t	T	t
Desnaturalización inicial	95	12 min	95	12 min
Desnaturalización	94	15 s	94	15 s
Hibridación	50	15 s	55	15 s
Extensión	72	15 s	72	15 s
Ciclos	10		10	
Desnaturalización	89	15 s	89	15 s
Hibridación	50	15 s	55	15 s
Extensión	72	15 s	72	15 s
Ciclos	30		30	
Extensión Final	72	10min	72	10min
Hold Final	4	∞	4	∞

Tabla XI. Composición de la mezcla de reacción de PCR para SSRs nucleares.

Componente (Concentración inicial)	Concentración Final
Buffer <i>Taq</i> NH ₄ SO ₄ (10 X)	1 X
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM
dNTPs (2 mM)	0,2 mM
<i>Primer</i> (10 mM)	0,2 mM
<i>Taq</i> (5 U/μl)	1 U
ADN (38 ng/μl)	1/50
Agua UP c.s.p.	25 μl

III.4.3 Análisis de regiones informativas en el genoma cloroplástico de *C.brasiliense*

III.4.3.1 Amplificación de microsatélites cloroplásticos o cpSSRs

Con el objeto de evaluar la informatividad contenida en regiones microsatélites cloroplásticas en *C. brasiliense*, se seleccionaron cebadores universales para ADNcp sugeridos en la literatura (Taberlet *et al.*, 1991; Weising & Gardner, 1999) detallados en la Tabla XII. Las condiciones de ciclado fueron optimizadas tomando como referencia los perfiles sugeridos por los autores (Tabla XIII).

III.4.3.1.1 Diseño de *primers* internos para el Intrón del gen *trnL* en el ADNcp de *C. brasiliense*

A partir de las secuencias obtenidas pertenecientes al intrón del gen *trnL*, fueron diseñados un par de cebadores internos con la ayuda del *software* Primer3 v. 0.4.03⁵, describiéndose así el primer par de cebadores para la especie (Percuoco *et al.*, en preparación). Las condiciones de ciclado para los nuevos *primers* identificados como *Cbra_F* y *Cbra_R* se detallan en la Tabla XIII, asimismo que las características de los cebadores se detallan en la Tabla XII.

⁵<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

Tabla XII. Detalle de las secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación de los diferentes *loci* microsatélites cloroplásticos seleccionados para el presente análisis.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Motivos	Referencia	Tamaño esperado ^(*)
TrnLc (F)	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	(A) ₁₁ ;(A) ₁₀	Taberlet, 1991	577 pb (<i>Nicotiana tabacum</i>), 699 pb (<i>Clusia sp.</i>)
TrnLd (R)	GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	(TA) ₆ ;(A) ₁₀		
Ccmp2 (F)	GAT CCC GGA CGT AAT CCT G	(A) ₁₁	Weising & Gardner, 1999	77-189 pb(varias) 120-150 pb (<i>C. brasiliense</i>)
Ccmp2 (R)	ATC GTA CCG AGG GTT CGA AT			
Cbra_F	AAA ATG GGC AAT CCT GAG C	-	Desarrollados en este trabajo	498 pb
Cbra_R	ATG GGA CTC TAT CTT TAT TCT CG			

(*) Se indica la/s especie/s en la/s que fue ensayado

Tabla XIII. Detalle de las condiciones de ciclado de los cpSSRs del Intrón del gen *trnL*, par de cebadores internos diseñados y ccmp2 optimizadas para *C. brasiliense*. **T**: Temperatura (°C) y **t**: tiempo (min).

Etapas	SSRs Cloroplásticos					
	Intrón gen <i>trnL</i>		Interno Intrón gen <i>trnL</i>		ccmp2	
	T	t	T	t	T	t
Desnaturalización inicial	94	5			94	5 min
Desnaturalización	93	1	93	1 min	94	1 min
Hibridación	62	1	60	1 min	60	1 min
Extensión	72	2 min	72	2 min	72	1 min
Ciclos	35		35		30	
Extensión Final	72	4min	72	4 min	72	10 min
Hold Final	4	∞	4	∞	4	∞

III.4.3.2 Amplificación de regiones cloroplásticas intergénicas en *C. brasiliense*

Teniendo en cuenta que las regiones intergénicas cloroplásticas han mostrado ser informativas en *C. brasiliense* y especies relacionadas (Zakaria, 2003; Ruhfel *et al.*, 2011; Néri, 2011) se ensayaron perfiles de amplificación de seis regiones intergénicas sugeridas en la literatura, utilizando cebadores universales para ADNcp. Los *primers* utilizados fueron sintetizados y provistos por IDT® (*Integrated DNA Technoloigeies*) o por Macrogen Corea cuyas características se especifican en la Tabla XIV. A partir de la secuencia de los cebadores, se estimaron las T_m según la siguiente fórmula: $T_m = 4 (G+C) + 2(A+T)$. Cada amplificación se realizó de forma independiente para ambos pares de *primers*. Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador PERKIN ELMER *GeneAmp System 9600* (*Applied Biosystems*) en un volumen final de 25 μ l. La concentración de cada uno de los componentes incorporados se detallan en la Tabla XV; en tanto que las condiciones de ciclado se describen en la Tabla XVI.

III.4.3.3 Secuenciación de amplicones cloroplásticos

Se seleccionaron al azar amplicones de cada región (al menos 1 individuo por región y por población) los que fueron purificados utilizando el kit *GFX™PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, #28-9034-70). Este kit puede ser aplicado para purificar ADN a partir de geles de agarosa, así como también para purificar productos de PCR mayores a 100 pb. Debido al tamaño de los amplicones obtenidos, y para evitar disminución en el rendimiento de los mismos, se optó por purificar los productos de PCR en solución, siguiendo las recomendaciones del proveedor. El procedimiento consistió en el uso de un agente caotrópico que desnaturaliza proteínas, disuelve agarosa, y promueve la unión del ADN

Tabla XIV. Detalle de las secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación de las distintas regiones intergénicas seleccionadas para el análisis.

Región intergénica	Secuencia (5'→3')	Referencia	Tamaños esperados ^(*)
<i>psbC-trnS</i> (UGA)	GGT CGT GAC CAA GAA ACC AC GGT CCG AAT CCC TCT CTC TC	Demesure <i>et al.</i> (1995)	1680 pb (<i>Quercus robur</i>)
<i>trnH</i> (GUG)- <i>psbA</i>	ACT GCC TTG ATC CAC TTG GC CGA AGC TCC ATC TAC AAA TGG	Hamilton (1999)	495 pb (<i>Nicotiana tabacum</i>)
<i>trnS</i> (GCU)- <i>trnG</i>	GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC GAACGAATCACA CTTTACCAC	Hamilton (1999)	844 pb (<i>Nicotiana tabacum</i>)
<i>trnS</i> (GCU)- <i>trnG</i> -intron- <i>trnG</i>	AAC TCG TAC AAC GGA TTA GCA ATC GAA TCG AAC CCG CAT CGT TAG	Shaw <i>et al.</i> (2007)	1434 pb (universales, Eurosid I)
<i>petG-trnP</i>	GGT CTA ATT CCT ATA ACT TTG GC GGG ATG TGG CGC AGC TTG G	Huang <i>et al.</i> (2004)	350 pb (<i>Trochodendron araliodes</i>)
<i>psbJ-petA</i>	CTC TTT GGT TGA TAG GTA CTG GGA GAT GCA GAG ATA GTA C	Huang <i>et al.</i> (2004)	752 pb (<i>Trochodendron araliodes</i>)
<i>psbJ-petA</i>	AAC AGT TTG AGA AGG TTC AAT T ATA GGT ACT GTA ACT GGT ATT	Shaw <i>et al.</i> (2007)	734-1261 pb (universales)
<i>rpl32-trnL</i> (UAG)	CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT CAG TTC CAA AAA AAC GTA CTT C	Shaw <i>et al.</i> (2007)	543-1417 pb (universales)

^(*) Se indica la/s especie/s en la/s que fue ensayado

Tabla XV. Composición de las mezclas de reacción optimizadas para las regiones intergénicas en *C. brasiliense*.

Componentes (Concentración inicial)	Concentración final			
	(<i>psbC-trnS</i>)	(<i>trnH-psbA</i>)	(<i>trnS-trnG</i>)	Varias ^(*)
Buffer <i>Taq</i> SO ₄ (NH ₄) ₂ (10X)	1X	1X	1X	1X
MgCl ₂ (25mM)	2,5mM	2,5mM	2mM	2mM
dNTPs (2mM)	0,1mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM
Cebador F (10μM)	0,2μM	0,3μM	0,4μM	0,1μM
Cebador R (10μM)	0,2μM	0,3μM	0,4μM	0,1μM
BSA (10 mg/ml)	5μg/μl	2,5 μg/μl	2,5 μg/μl	-
<i>Taq</i> ADN pol ^b (5U/μl)	1U/25μl	1U/25μl	1U/25μl	1U/25μl
ADN (50 μg/μl)	1/10	1/10	1/10	1/10
Agua	c.s.p.	c.s.p.	c.s.p.	c.s.p.
Volumen Final	25μl	25μl	25μl	25μl

^(*)*trnS-trnG-trnG*, *petG-trnP*, *psbJ-petA*, *rpl32-trnL*

^adNTPs (Fermentas, #R0181).

^b*Taq* ADN Polimerasa Recombinante (Fermentas, #EP0402).

Tabla XVI. Detalles de los perfiles de ciclado optimizados para cada región intergénica. **T:** Temperatura (°C). **t:** tiempo.

	<i>psbC – trnS</i>		<i>trnH-psbA</i>		<i>trnS-trnG</i>		<i>rpl32-trnL</i>		Varias^(*)	
Etapas	T	t	T	t	T	t	T	t	T	t
Desnaturalización Inicial	94	4 min	96	5 min	96	5 min	96	5 min	80	5 min
Desnaturalización	94	45 s	94	30 s	94	45 s	94	45 s	95	1 min
Hibridación	57	45 s	62	30 s	55	1 min	55	1 min	50	1 min
Extensión	72	2 min	72	30 s	72	1 min	72	1,5 min	65	4 min
Ciclos	30		35		30		30		35	
Extensión Final	72	10 min	-	-	72	10 min	72	10 min	65	10 min
Hold Final	4	∞	4	∞	4	∞	4	∞	4	∞

^(*)*trnS-trnG-trnG, petG-trnP, psbJ-petA*

bicatenario a una matriz de fibra de vidrio contenida en columnas. Una vez que el ADN fue capturado en esta matriz, las proteínas y contaminantes fueron eliminados en sucesivos lavados. Seguidamente el ADN fue recuperado por elusión en Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Finalizado el proceso de purificación, las muestras fueron acondicionadas y enviadas a MACROGEN© Corea del Sur para su secuenciación.

III.4.3.4 Obtención de perfiles de restricción en ADN cloroplástico (ADNcp-RFLPs)

La secuenciación de algunas secuencias de cada región permitió seleccionar endonucleasas de restricción (ER) para realizar un ensayo de restricción tomando en primer lugar la región *psbC-trnS* como blanco.

III.4.3.4.1 Selección de endonucleasas de restricción (ER)

Una vez realizado el análisis de las secuencias obtenidas a partir de *psbC-trnS* se ensayaron digestiones virtuales mediante el programa NEBcutter v2.0⁶ (Vincze *et al.*, 2003) a fin de seleccionar las endonucleasas de restricción (ER) que permitan definir patrones de digestión claros. Los criterios adoptados para la selección de la ER se basaron en: (a) número de sitios diana presentes en el fragmento amplificado, (b) que la ER no requiera de regiones metiladas para generar los cortes y (c) que los diferentes fragmentos productos de la digestión pudieran ser perfectamente discriminados en geles de agarosa al 2%. Posteriormente se realizó un análisis de las enzimas preseleccionadas por medio de la realización de corridas electroforéticas virtuales, una opción brindada por el programa, para estimar el número de fragmentos generados y predecir el peso molecular de los mismos.

⁶<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

III.4.3.4.2 Digestión enzimática de los productos amplificados

La región amplificada *psbC-trnS* se digirió con la ER *MboI* (*New England BioLabs*, R0147S). Los componentes de la mezcla de digestión se detallan en la Tabla XVII. La temperatura de actividad enzimática fue de 37 °C por un lapso de 4 h de incubación con el objeto de conseguir un corte óptimo de los fragmentos de interés. Luego se realizó la corrida electroforética en gel de agarosa al 2% para la visualización de los patrones obtenidos. Para el fotodocumentado de los perfiles se procedió de igual forma que lo detallado en ítems previos.

Tabla XVII. Mezcla de reacción para la ER *MboI*.

Componentes	Concentración final
Enzima de restricción (<i>MboI</i> *)	7,5 U
Buffer 4	10 X
Producto de amplificación	50 µg/µl

(*) *New England Biolabs*

III.4.3.4.3 Análisis de los perfiles cloroplásticos obtenidos por digestión con *MboI*

A partir del análisis de los patrones de digestión obtenidos en cada uno de los individuos analizados se identificaron haplotipos, describiéndose los patrones de bandas correspondientes para cada uno. Un haplotipo corresponde al número de asociaciones diferentes entre los estados de los *loci* amplificados que se encontraron en los individuos analizados (Hartl & Clark, 2007). En este caso, los estados de cada región amplificada están dados por la presencia/ausencia de los sitios de restricción.

III.4.3.5 Análisis de las secuencias cloroplásticas obtenidas

Luego del ensayo de restricción, sin embargo, se optó por secuenciar 5-12 productos de PCR de cada población de las regiones que mostraron diferencias al menos entre individuos de distintas poblaciones.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos nucleotídica de GenBank de NCBI⁷ y alineadas mediante BLASTn 2.2.28⁸ (Zheng *et al.*, 2000) con el objeto de verificar su identidad. Luego fueron analizadas mediante los software disponibles *on line*: Chromas Lite v.2.01⁹ y Bioedit v.7.0.9.0¹⁰ (Hall, 1999).

Las secuencias fueron inspeccionadas manualmente, editadas y posteriormente se efectuaron alineamientos múltiples con el programa BioEdit (Hall, 1999). A continuación se realizó el análisis de los alineamientos mediante DnaSP v.5.10.1¹¹ (Rozas *et al.*, 1995) para obtener el número de haplotipos (*h*), *gaps*, sitios polimórficos (*S*), alelos por sitio polimórfico, sitios informativos o parsimoniosos (dos nucleótidos distintos en al menos 2 del total de secuencias), sitios no informativos o *singletons*.

⁷<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

⁸ http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome

⁹ http://technelysium.com.au/?page_id=13

¹⁰ <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

¹¹ <http://www.ub.edu/dnasp/>

La diversidad haplotípica (**Hd**) fue calculada según Nei (1987) como:

$$Hd = \frac{N}{N-1} \left(1 - \sum_i x_i^2 \right)$$

donde x_i es la frecuencia de cada haplotipo en la muestra de tamaño N .

El promedio de sustituciones por sitio entre dos secuencias se estima a través del cálculo de la diversidad nucleotídica (π) de Nei (1987) y su variancia se estimó como:

$$\pi_n = \frac{\sum_{i=1}^n (\sum_{j=1}^i x_i x_j \pi_{ij})}{L}$$

$$var(\pi_n) = 1 + \frac{n+1}{3(n-1)L} \pi_n + \frac{2(n^2+n+3)}{9n(n-1)} \pi_n^2$$

donde π_{ij} es la proporción de nucleótidos diferentes entre las secuencias i y j . x_i y x_j son las frecuencias de i y j . L corresponde a la longitud de la secuencia considerada y n al tamaño muestral.

El grado de diferenciación genética entre las poblaciones fue descripto a través de la estimación de F_{ST} con el programa DNASP.

Se asumió un modelo de evolución neutral para las secuencias analizadas (Kimura, 1978). Para verificar este supuesto se realizaron tests de neutralidad basados entre distintos estimadores del estadístico θ . Éste es equivalente al producto $Ne\mu$ estimado por sitio, donde Ne es el tamaño efectivo de la población y μ es la tasa de mutación neutral por sitio nucleotídico por generación. En el caso de genomas haploides, como el ADN cloroplástico,

$\theta = 2Ne\mu$. Este parámetro puede estimarse a partir de los sitios segregantes (θ_S) como a partir del promedio de diferencias pareadas (θ_π) Tajima (1989). En el caso de las secuencias analizadas, se computaron los siguientes tests:

Tajima's D : este test consiste en el cálculo de la diferencia entre los dos estimadores de θ ($\theta_\pi - \theta_S$). En el caso de cumplirse la hipótesis nula de evolución molecular neutral, se espera que tal diferencia sea igual a 0. Los valores negativos y/o positivos se relacionan con la sensibilidad de cada estimador frente a fluctuaciones demográficas (Wayne & Simonsen, 1998). La obtención de valores negativos es adjudicable a fluctuaciones demográficas como deriva génica y crecimiento poblacional, aunque también pueden deberse a evolución por selección o a procesos de selección purificadora. Por el contrario, los valores positivos se relacionan con existencia de estructuración poblacional y selección equilibradora. La expresión matemática del estadístico D está dada por Tajima (1989):

$$D = \frac{d}{\sqrt{\hat{V}(d)}} = \frac{\hat{k} - \frac{S}{a_1}}{\sqrt{[e_1 S + e_2 S(S-1)]}}$$

Fu's F_S : A diferencia del test de Tajima, el fundamento del estadístico F_S de Fu (1997) es que luego de la aparición de mutaciones recientes en uno o unos pocos individuos se incrementará el número de alelos, sin alterar el valor de θ_π en la misma medida. La estimación se basa en la probabilidad S' de que en un conjunto de n secuencias haya al menos k alelos, dado determinado valor de θ_π . En una muestra con exceso de mutaciones recientes, la estimación de θ a partir de θ_π probablemente será menor que aquella basada en el número de alelos, por lo cual S' tomará valores negativos. De esta manera, se comporta como un buen

indicador para detectar el surgimiento de varias mutaciones recientes (Fu, 1997). Se estima como:

$$F_S = \ln \frac{S'}{(1 - S')}$$

La interpretación de los dos tests de neutralidad se realizó en función de los intervalos de confianza (99%) calculados para los estadísticos D y F_S .

A través de métodos filogenéticos tradicionales, se elaboraron filogramas optándose por el método de máxima parsimonia con el programa MEGA v.5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Además, se elaboraron redes de haplotipos con el programa Network v.4.611¹² (Bandelt *et al.*, 1999) con base en el algoritmo *median joining*.

III.4.3.6 Esquematización del genoma de *C. brasiliense*

Se identificaron los genomas cloroplásticos disponibles en la base de datos de GenBank pertenecientes a especies taxonómicamente cercanas. Teniendo en cuenta la sintenia de este genoma plastidial, se tomaron sus mapas genéticos físicos para esquematizar las regiones de *C. brasiliense* conocidas mediante el uso del *software* DNAPlotter¹³ (Carver *et al.*, 2009). En esta representación se incorporaron otras tres regiones disponibles (al 11/01/2014) en GenBank pertenecientes a *C. brasiliense* de Puerto Rico (HQ331550.1, HQ331853.1) y Costa Rica (JQ591092.1).

¹² <http://www.fluxus-engineering.com/sharepub.htm#a1>

¹³ <http://www.sanger.ac.uk/resources/software/dnaplotter/>



IV.Resultados

IV. Resultados

IV.1 Regiones informativas en el genoma nuclear de *C. brasiliense*

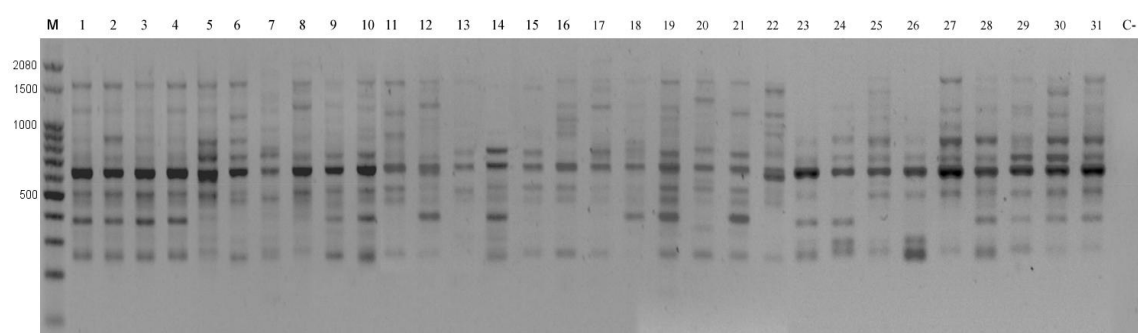
IV.1.1 Obtención de perfiles RAPDs en las poblaciones de San Ignacio y Rincón Ombú

La totalidad de los individuos pertenecientes a las poblaciones de SI (N=31) y RO (N=30) pudieron ser evaluados a través de perfiles RAPDs. A partir de los 20 cebadores de la Serie A y B analizados, se seleccionaron los *primers* A03, A05, B06 y B10 para realizar la caracterización genética, por cuanto exhibieron una resolución adecuada, reproducibilidad de los patrones de amplificación (ninguno de los *primers* seleccionados mostró perfiles no reproducibles. Ver Anexo I) como así también por el nivel de polimorfismo revelado en los *loci* amplificados. En las Figuras 8a-b, 9a-b y 10a-c se muestran los perfiles RAPDs obtenidos para los 61 individuos evaluados por medio de los cuatro cebadores mencionados. En el caso del primer A05, no fue posible obtener perfiles RAPDs particularmente en los individuos de RO, por lo que éste fue excluido del análisis interpoblacional, realizado a través de los 56 marcadores restantes.

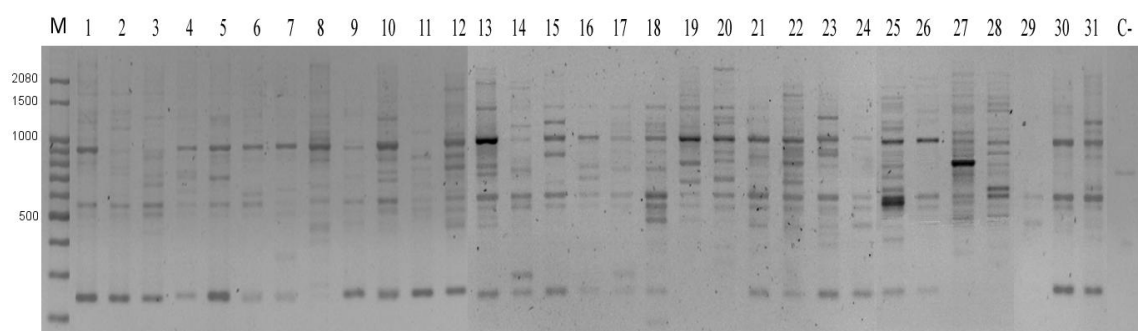
IV.1.2 Obtención de perfiles ISSRs en las poblaciones de San Ignacio y Rincón Ombú

Se realizaron sucesivos intentos de optimización de los 33 marcadores ISSRs disponibles. Entre los factores controlables de la reacción de amplificación, se modificaron las concentraciones de los componentes y se incorporó betaína 1M (Sigma-Aldrich), compuesto capaz de mejorar el rendimiento de la *Taq* Polimerasa en la amplificación de regiones ricas en GC (Henke *et al.*, 1997; Ralser *et al.*, 2006). Por otro lado, se ensayaron los perfiles mencionados con variantes en las temperaturas de *annealing*, siendo imposible contar con resultados evaluables para la totalidad de los individuos y/o para ambas poblaciones. En la

Figura 11 a-c puede apreciarse los amplicones de distintos *primers*. En función de los resultados obtenidos, se optó por limitar el análisis poblacional a los marcadores RAPDs.

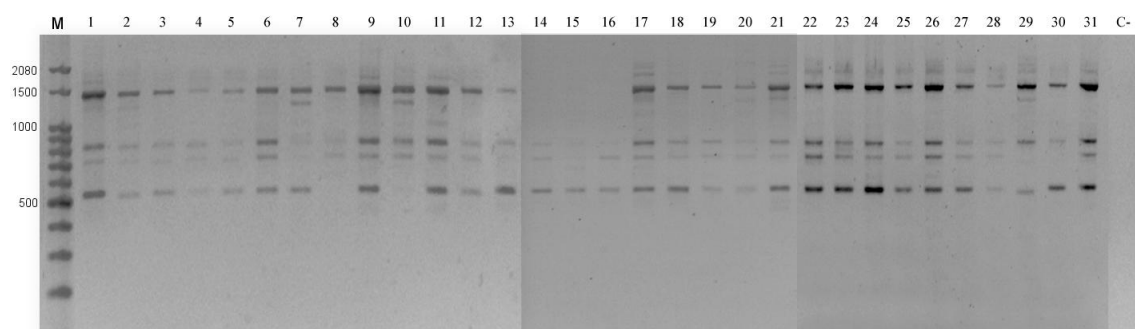


a.

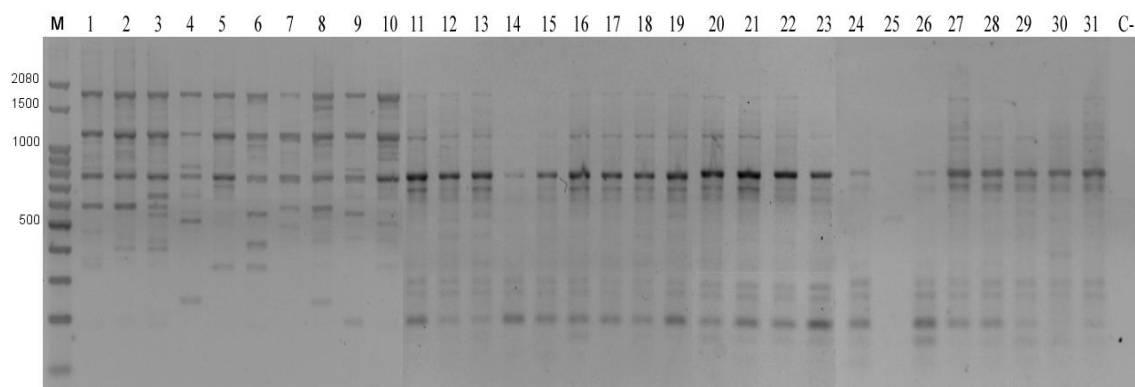


b.

Figura 8.Perfiles RAPDs obtenidos en la población de *C. brasiliense* de San Ignacio. **a.** *primer* A03. **b.** *primer* A05. **M:** 100 pb *Ladder* (PB-L Productos Biológicos). **C-:** control negativo. Calles 1 a 31: individuos de *C. brasiliense* analizados. Gel de agarosa al 1,5%.

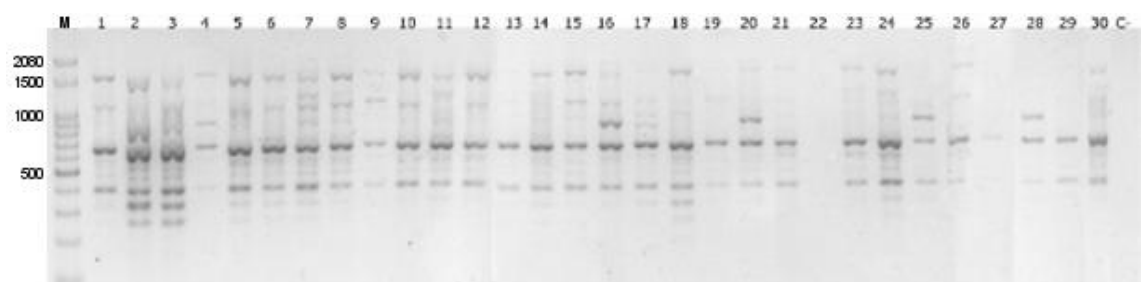


a.

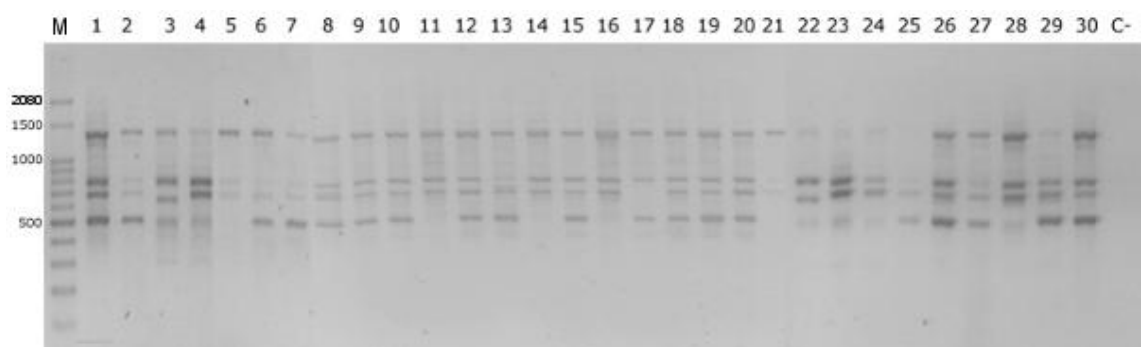


b.

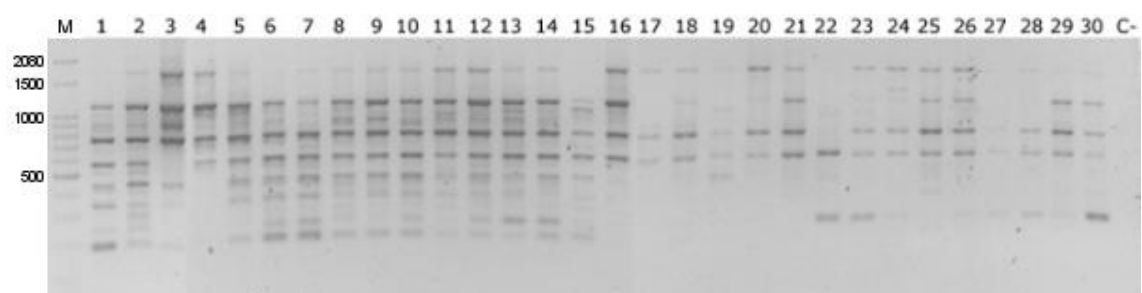
Figura 9. Perfiles RAPDs obtenidos en la población de *C. brasiliense* de San Ignacio. **a.** primer B06. **b.** primer B10. **M:** 100 pb *Ladder* (PB-L Productos Biológicos). **C-:** control negativo. Calles 1 a 31: individuos de *C. brasiliense* analizados.



a.



b.



c.

Figura 10. Perfiles RAPDs obtenidos en la población de *C. brasiliense* de Rincón Ombú. **a.** *Primer*A03. **b.** *Primer* B06. **c.** *Primer*B10. **M:** 100 pb *Ladder* (PB-L Productos Biológicos). **C-:** control negativo. Calles 1 a 30: individuos de *C. brasiliense* analizados.

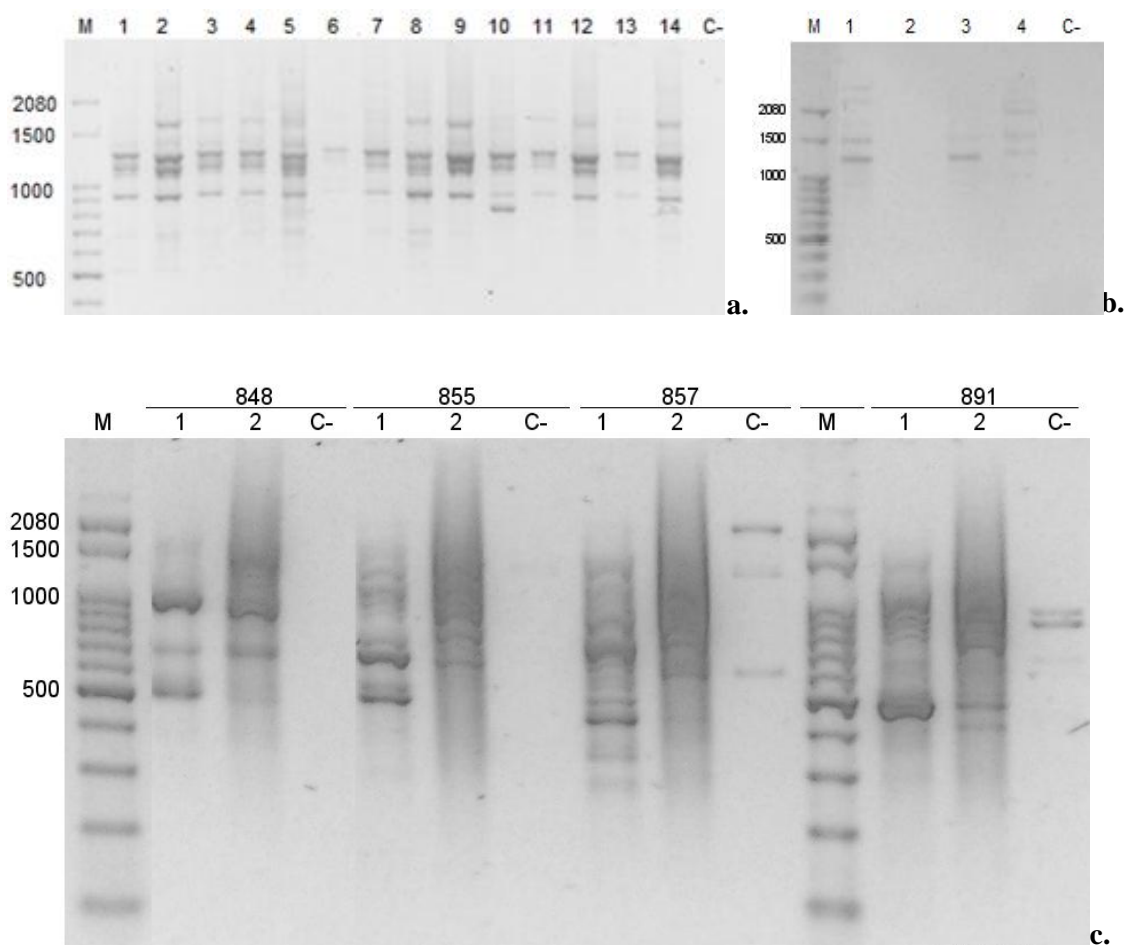


Figura 11. Ejemplos de perfiles obtenidos durante la optimización de los ISSRs con individuos de SI y RO.
a. *Primer* 808. **b.** *Primer* 866. **c.** Se identifican perfiles obtenidos para cuatro *primers* diferentes especificados sobre la imagen. **C-:** control negativo. **M:** 100pb *Ladder* Productos Bio-Lógicos.

IV.1.3 Variabilidad Genética estimada a partir de perfiles RAPDs

IV.1.3.1 Estimación de frecuencias alélicas y análisis poblacional

En el análisis de la variabilidad genética de la población de *C. brasiliense* procedente de la localidad de San Ignacio, los cebadores A03, A05, B06 y B10 generaron un total de 78 bandas con tamaños moleculares partiendo de aproximadamente 180 hasta 1.850 pb. Cada *locus* fue nominado con el nombre del *primer* que lo generó y el tamaño de la banda obtenida. Cada cebador reveló entre 13 y 24 bandas, con un promedio de 19,75 bandas por cebador (Tabla XVIII).

De los 78 *loci* revelados, 75 (96,1%) fueron polimórficos, mientras que se observaron alelos exclusivos en cada una de las poblaciones (Tabla XIX), existiendo además 5 *loci* (3,9%) monomórficos para alguna de las poblaciones, destacados en la Tabla XX. El único *locus* monomórfico para ambas poblaciones fue B06-0800, no obstante se identificaron *loci* monomórficos dentro de cada población.

Tabla XVIII. Información referida a los marcadores obtenidos para los *primers* seleccionados. **NTB:** Número Total de Bandas. **NBP:** Número de Bandas Polimórficas. **PP:** Porcentaje de *Loci* Polimórficos.

<i>Primer</i>	NTB	NBP	PP	Tamaño de los amplicones (pb)
A03	19	18	94,7	245 - 1630
A05	22	20	90,9	182 - 1850
B06	13	12	92,3	325 - 1780
B10	24	24	100	198 - 1750
Total	78	75	94,9	182 - 1850

Tabla XIX. Porcentaje de *loci* Polimórficos.

Población	%P
San Ignacio	80,36%
Rincón Ombú	83,93%
Media	82,14%
ES*	1,79%

* *Error estándar*

A partir de la interpretación de los perfiles RAPDs obtenidos, se confeccionó una matriz binaria, en donde se detallaron los *loci* presentes (1) o ausentes (0) para cada uno de los individuos de las poblaciones de San Ignacio y Rincón Ombú (ver Anexo II). Seguidamente esta Tabla de doble entrada fue utilizada para realizar el cálculo de parámetros genético-poblacionales de interés.

Los *loci* determinados, la frecuencia de cada banda, las frecuencias alélicas (p y q), el número de alelos (n_a), el número efectivo de alelos (n_e), el índice de Shannon (I) y la heterocigosidad esperada (He) estimados para cada población y en conjunto (total) se detallan en la Tabla XX, y sus medias y errores estándares (ES) se resumen en la Tabla XXI. En la Figura 12 pueden apreciarse en forma gráfica la distribución de las frecuencias génicas estimadas (12a y b) y una comparación entre los patrones de bandas encontrados en ambas poblaciones (12c). Una vez estimados estos parámetros fue posible obtener la distancia genética de Nei D , que resultó igual a 0,185.

Tabla XX. Parámetros poblacionales estimados, discriminados por población y por locus. f_{banda} : frecuencia de banda. Frecuencias alélicas (p y q), número de alelos (n_a), número efectivo de alelos (n_e), índice de información de Shannon (I) y heterocigosidad esperada (H_e). Sombreado: loci monomórficos. Negrita: loci exclusivos.

Población	Locus	f_{banda}	p	q	n_a	n_e	I	H_e
San Ignacio	A03-1630	0,710	0,461	0,539	2,000	1,988	0,690	0,505
	A03-1510	0,226	0,120	0,880	2,000	1,268	0,367	0,215
	A03-1440	0,323	0,177	0,823	2,000	1,411	0,467	0,296
	A03-1298	0,129	0,067	0,933	2,000	1,142	0,245	0,127
	A03-1200	0,516	0,304	0,696	2,000	1,735	0,615	0,430
	A03-1115	0,129	0,067	0,933	2,000	1,142	0,245	0,127
	A03-1020	0,194	0,102	0,898	2,000	1,224	0,329	0,186
	A03-0950	0,258	0,139	0,861	2,000	1,314	0,402	0,243
	A03-0870	0,645	0,404	0,596	2,000	1,929	0,675	0,490
	A03-0785	0,323	0,177	0,823	2,000	1,411	0,467	0,296
	A03-0730	0,645	0,404	0,596	2,000	1,929	0,675	0,490
	A03-0640	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000
	A03-0594	0,065	0,033	0,967	2,000	1,068	0,144	0,064
	A03-0545	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
	A03-0500	0,935	0,746	0,254	2,000	1,610	0,567	0,385
	A03-0450	0,710	0,461	0,539	2,000	1,988	0,690	0,505
	A03-0380	0,323	0,177	0,823	2,000	1,411	0,467	0,296
	A03-0340	0,452	0,259	0,741	2,000	1,624	0,573	0,391
	A03-0245	0,871	0,641	0,359	2,000	1,853	0,653	0,468
	B06-1780	0,677	0,432	0,568	2,000	1,964	0,684	0,499
	B06-1670	0,839	0,598	0,402	2,000	1,925	0,674	0,489
	B06-1440	0,968	0,820	0,180	2,000	1,418	0,471	0,300
	B06-1280	0,355	0,197	0,803	2,000	1,462	0,496	0,321
	B06-1192	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
	B06-0991	0,032	0,016	0,984	2,000	1,033	0,083	0,033
	B06-0800	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000
	B06-0744	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
	B06-0700	0,968	0,820	0,180	2,000	1,418	0,471	0,300
	B06-0660	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
	B06-0500	0,935	0,746	0,254	2,000	1,610	0,567	0,385
	B06-0432	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
	B06-0325	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
	B10-1750	0,935	0,746	0,254	2,000	1,610	0,567	0,385
	B10-1273	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
	B10-1140	0,968	0,820	0,180	2,000	1,418	0,471	0,300
	B10-1021	0,258	0,139	0,861	2,000	1,314	0,402	0,243
	B10-0980	0,581	0,352	0,648	2,000	1,840	0,649	0,464
	B10-0903	0,355	0,197	0,803	2,000	1,462	0,496	0,321
	B10-0839	0,290	0,158	0,842	2,000	1,361	0,436	0,270
	B10-0806	0,387	0,217	0,783	2,000	1,515	0,523	0,346
	B10-0752	0,935	0,746	0,254	2,000	1,610	0,567	0,385
	B10-0734	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
	B10-0707	0,161	0,084	0,916	2,000	1,182	0,289	0,157
	B10-0645	0,452	0,259	0,741	2,000	1,624	0,573	0,391
	B10-0550	0,613	0,378	0,622	2,000	1,887	0,663	0,478

Tabla XX.continuación.

Población	Locus	<i>f</i> banda	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>n_a</i>	<i>n_e</i>	<i>I</i>	<i>He</i>
	B10-0526	0,419	0,238	0,762	2,000	1,569	0,549	0,369
	B10-0495	0,097	0,050	0,950	2,000	1,104	0,197	0,096
	B10-0458	0,290	0,158	0,842	2,000	1,361	0,436	0,270
	B10-0425	0,290	0,158	0,842	2,000	1,361	0,436	0,270
	B10-0393	0,129	0,067	0,933	2,000	1,142	0,245	0,127
	B10-0380	0,032	0,016	0,984	2,000	1,033	0,083	0,033
	B10-0356	0,226	0,120	0,880	2,000	1,268	0,367	0,215
	B10-0331	0,258	0,139	0,861	2,000	1,314	0,402	0,243
	B10-0264	0,516	0,304	0,696	2,000	1,735	0,615	0,430
	B10-0243	0,387	0,217	0,783	2,000	1,515	0,523	0,346
	B10-0198	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
Rincón Ombú	A03-1630	0,222	0,118	0,882	2,000	1,263	0,363	0,212
	A03-1510	0,667	0,423	0,577	2,000	1,953	0,681	0,497
	A03-1440	0,111	0,057	0,943	2,000	1,121	0,219	0,110
	A03-1298	0,259	0,139	0,861	2,000	1,316	0,404	0,244
	A03-1200	0,481	0,280	0,720	2,000	1,675	0,593	0,411
	A03-1115	0,630	0,391	0,609	2,000	1,910	0,669	0,485
	A03-1020	0,556	0,333	0,667	2,000	1,800	0,637	0,453
	A03-0950	0,407	0,230	0,770	2,000	1,549	0,540	0,361
	A03-0870	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
	A03-0785	0,370	0,207	0,793	2,000	1,487	0,509	0,334
	A03-0730	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
	A03-0640	0,963	0,808	0,192	2,000	1,451	0,490	0,317
	A03-0594	0,852	0,615	0,385	2,000	1,899	0,666	0,482
	A03-0545	0,630	0,391	0,609	2,000	1,910	0,669	0,485
	A03-0500	0,778	0,529	0,471	2,000	1,993	0,692	0,508
	A03-0450	0,074	0,038	0,962	2,000	1,078	0,161	0,074
	A03-0380	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000
	A03-0340	0,667	0,423	0,577	2,000	1,953	0,681	0,497
	A03-0245	0,593	0,362	0,638	2,000	1,858	0,654	0,470
	B06-1780	0,500	0,293	0,707	2,000	1,707	0,605	0,421
	B06-1670	0,500	0,293	0,707	2,000	1,707	0,605	0,421
	B06-1440	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000
	B06-1280	0,667	0,423	0,577	2,000	1,953	0,681	0,496
	B06-1192	0,267	0,144	0,856	2,000	1,326	0,412	0,250
	B06-0991	0,533	0,317	0,683	2,000	1,763	0,624	0,440
	B06-0800	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000
	B06-0744	0,067	0,034	0,966	2,000	1,070	0,148	0,067
	B06-0700	0,933	0,742	0,258	2,000	1,621	0,571	0,390
	B06-0660	0,433	0,247	0,753	2,000	1,593	0,559	0,379
	B06-0500	0,833	0,592	0,408	2,000	1,935	0,676	0,491
	B06-0432	0,533	0,317	0,683	2,000	1,763	0,624	0,440
	B06-0325	0,067	0,034	0,966	2,000	1,070	0,148	0,067
	B10-1750	0,867	0,635	0,365	2,000	1,864	0,656	0,471
	B10-1273	0,033	0,017	0,983	2,000	1,034	0,085	0,034
	B10-1140	0,867	0,635	0,365	2,000	1,864	0,656	0,471
	B10-1021	0,600	0,368	0,632	2,000	1,869	0,658	0,473
	B10-0980	0,333	0,184	0,816	2,000	1,428	0,477	0,305

B10-0903	0,500	0,293	0,707	2,000	1,707	0,605	0,421
B10-0839	0,533	0,317	0,683	2,000	1,763	0,624	0,440
B10-0806	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
B10-0752	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	0,000	0,000
B10-0734	0,233	0,124	0,876	2,000	1,279	0,376	0,222
B10-0707	0,233	0,124	0,876	2,000	1,279	0,376	0,222
B10-0645	0,200	0,106	0,894	2,000	1,233	0,337	0,192
B10-0550	0,967	0,817	0,183	2,000	1,425	0,475	0,304
B10-0526	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
B10-0495	0,367	0,204	0,796	2,000	1,481	0,506	0,330
B10-0458	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000
B10-0425	0,767	0,517	0,483	2,000	1,998	0,693	0,508
B10-0393	0,333	0,184	0,816	2,000	1,428	0,477	0,305
B10-0380	0,067	0,034	0,966	2,000	1,070	0,148	0,067
B10-0356	0,300	0,163	0,837	2,000	1,376	0,445	0,278
B10-0264	0,267	0,144	0,856	2,000	1,326	0,412	0,250
B10-0243	0,833	0,592	0,408	2,000	1,935	0,676	0,491
B10-0198	0,700	0,452	0,548	2,000	1,982	0,689	0,504

Tabla XXI. Media y error estándar (ES) de los parámetros estimados por población y en la población como un total.

Población		n_a	n_e	I	He
San Ignacio	Media	1,643	1,395	0,379	0,250
	ES	0,100	0,043	0,032	0,023
Rincón Ombú	Media	1,750	1,500	0,434	0,296
	ES	0,086	0,048	0,034	0,025
Total	Media	1,696	1,447	0,406	0,273
	ES	0,064	0,032	0,023	0,017

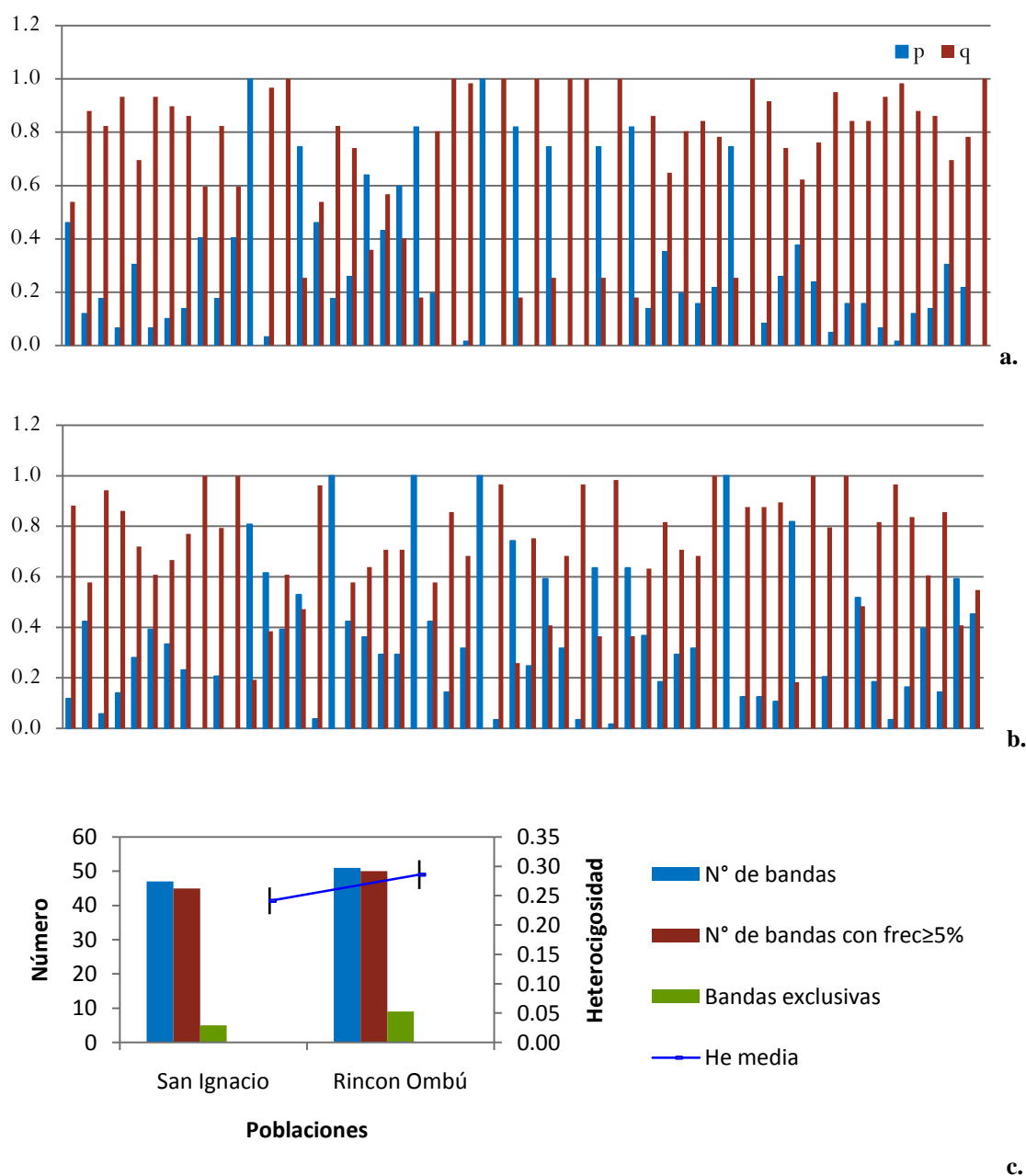


Figura 12. Distribución de las frecuencias génicas. **a.** Población de San Ignacio. **b.** Población de Rincón Ombú. **c.** Comparación entre los patrones de bandas totales, bandas con frecuencia mayor al 5%, bandas exclusivas y He .

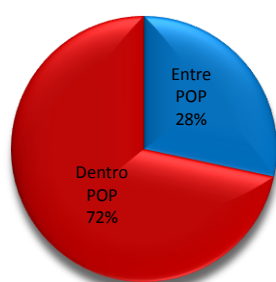
IV.1.3.2 Distribución de la variabilidad genética en las poblaciones de *C. brasiliense* provenientes de San Ignacio y Rincón Ombú

IV.1.3.2.1 Análisis molecular de la variancia (AMOVA)

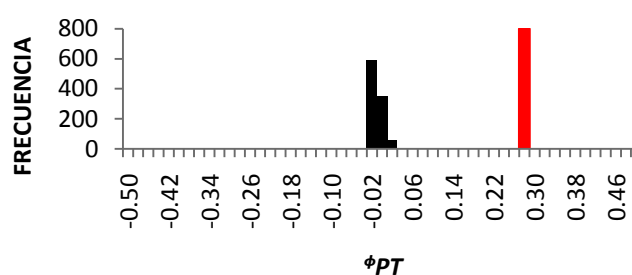
El Análisis Molecular de la Variancia reveló que la mayor parte de la variabilidad se encuentra distribuida dentro de las poblaciones (72%), por lo que la diferenciación intrapoblacional corresponde al 28% (Tabla XXII, Figura 13a). De acuerdo con este patrón de distribución, el parámetro ϕ_{PT} (0,283) es significativo para un nivel de confianza de 99% (Figura 13b). De esta manera la H_0 es rechazada, ya que queda demostrada la existencia de diferenciación entre las poblaciones de SI y RO, sugiriendo una gran diferenciación entre ambas poblaciones, según las categorías de interpretación establecidas por Wright (1978).

Tabla XXII. AMOVA en las poblaciones de San Ignacio y Rincón Ombú. Grados de libertad (df). Suma de Cuadrados (SC). Media de Cuadrados (MC).

	df	SC	MC	Varianza	% Varianza
Entre POP	1	106,531	106,531	3,226	28
Dentro POP	59	481,486	8,161	8,161	72
Total	60	588,017		11,387	100



a.



b.

Figura 13. AMOVA. **a.** Representación de la variabilidad genética total para las POP de San Ignacio y Rincón Ombú. **b.** Frecuencia de las 999 permutaciones efectuadas (en negro) comparadas con la estimación de ϕ_{PT} observado (rojo).

IV.1.3.2.2 Análisis de Componentes Principales (PCoA)

El análisis de componentes principales resolvió aproximadamente el 42% de la variabilidad genética en los primeros tres ejes (información presentada en la Tabla XXIII). Cuando se realizó el análisis para la totalidad de los individuos de ambas poblaciones, se encontró un valor apenas menor (38%). Las gráficas correspondientes pueden apreciarse en la Figura 14 y 15 a-b.

Tabla XXIII. Análisis de Componentes Principales. Porcentaje de la variabilidad genética explicada por los 3 primeros ejes.

	Eje 1	Eje 2	Eje 3
San Ignacio			
%	19,48	12,01	10,05
% acumulado	19,48	31,49	41,54
Rincón Ombú			
%	22,50	10,44	8,19
% acumulado	22,50	32,94	41,13
SI + RO			
%	20,32	10,42	7,81
% acumulado	20,32	30,74	38,55

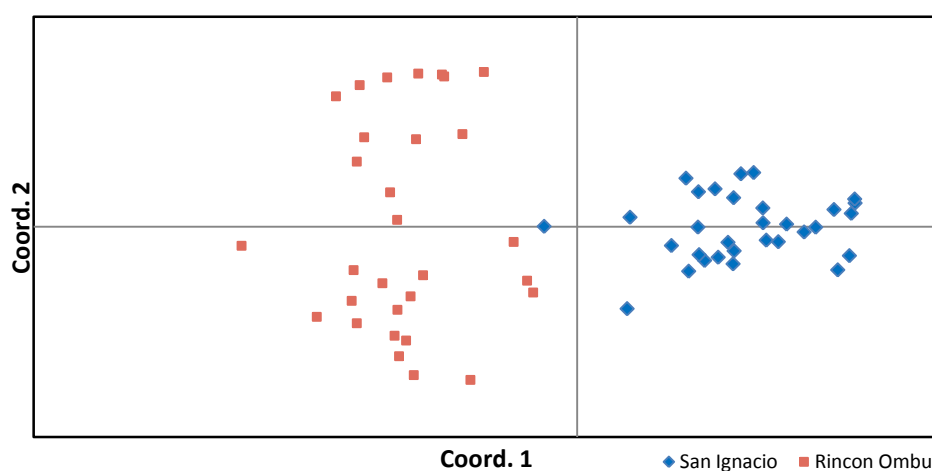


Figura 14. Análisis de Componentes Principales de la variabilidad genética para 56 marcadores RAPDs en las poblaciones de San Ignacio y Rincón Ombú.

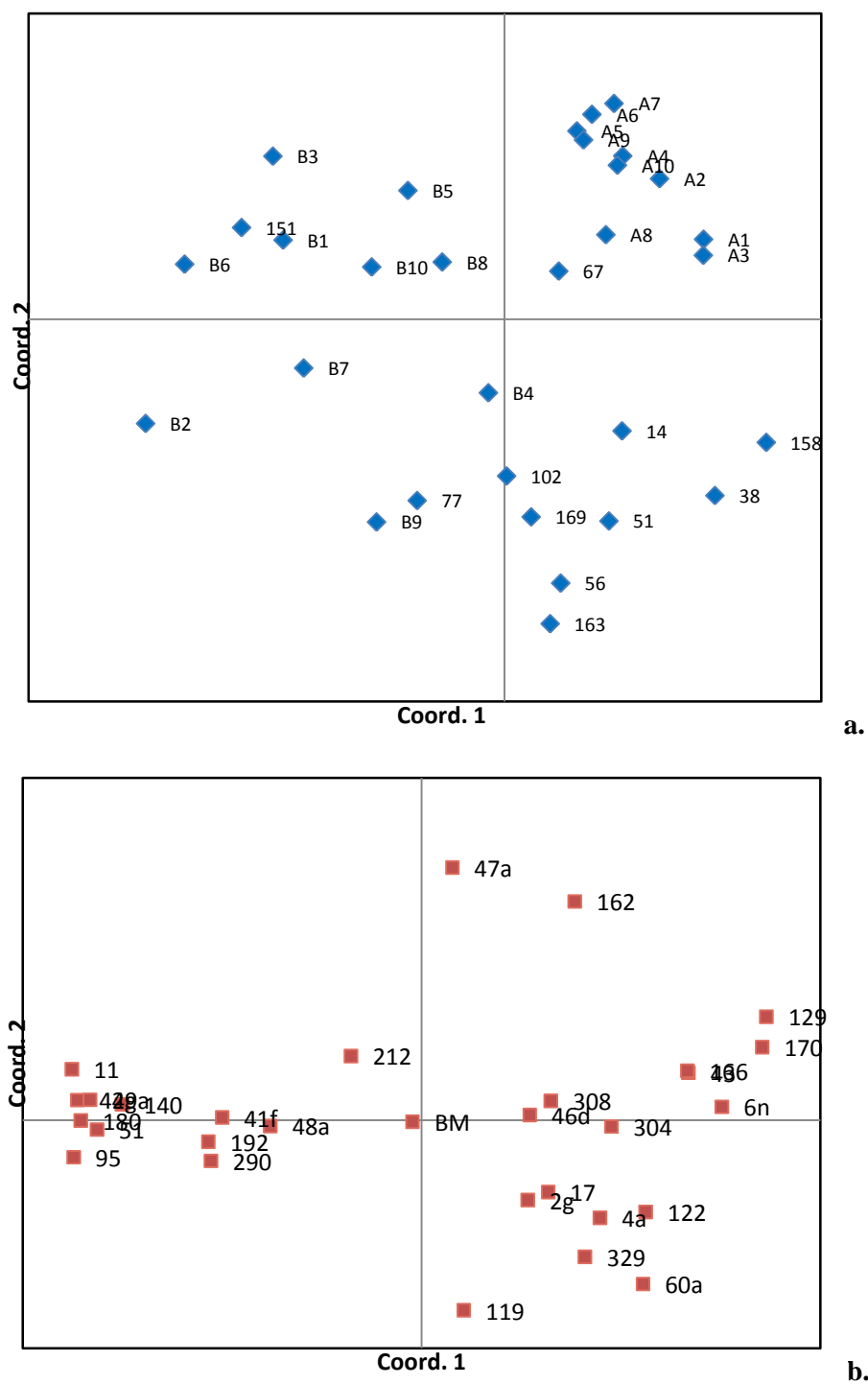


Figura 15. Análisis de Componentes Principales de la variabilidad genética para 56 marcadores RAPDs. **a.** San Ignacio. **b.** Rincón Ombú.

IV.1.3.2.3 Test de Mantel

El test de Mantel, al igual que el análisis de correlación genética espacial, requiere de matrices de distancias genética y geográfica de las poblaciones analizadas, las que fueron obtenidas para las poblaciones de San Ignacio y Rincón Ombú (Anexo III).

La prueba de Mantel fue significativa en San Ignacio, con un 95% de confianza, indicando la existencia de correlación entre las distancias genética y geográfica, si bien el coeficiente de correlación observado resultó francamente bajo (0,183). Por su parte, en Rincón Ombú no se obtuvo un valor significativo (Tabla XXIV). De esta manera, la hipótesis nula que afirma la inexistencia de correlación entre los elementos de las matrices genética y geográfica es rechazada para la población emplazada en la localidad de San Ignacio en Misiones, mientras que no puede ser refutada para la derivada de Rincón Ombú, en Corrientes. Las gráficas de cada correlación y la distribución de frecuencias de las 9.999 permutaciones pueden visualizarse en la Figura 16 y 17 respectivamente.

Tabla XXIV. Test de Mantel. Coeficientes de Correlación (R_{xy}) entre las matrices de distancia genética y geográfica con 9.999 permutaciones y $p=0,05$.

Población	R_{xy}	$P (R_{xy}^{perm} \geq R_{xy-obs})$
San Ignacio	0,183	0,007
Rincón Ombú	-0,084	0,069

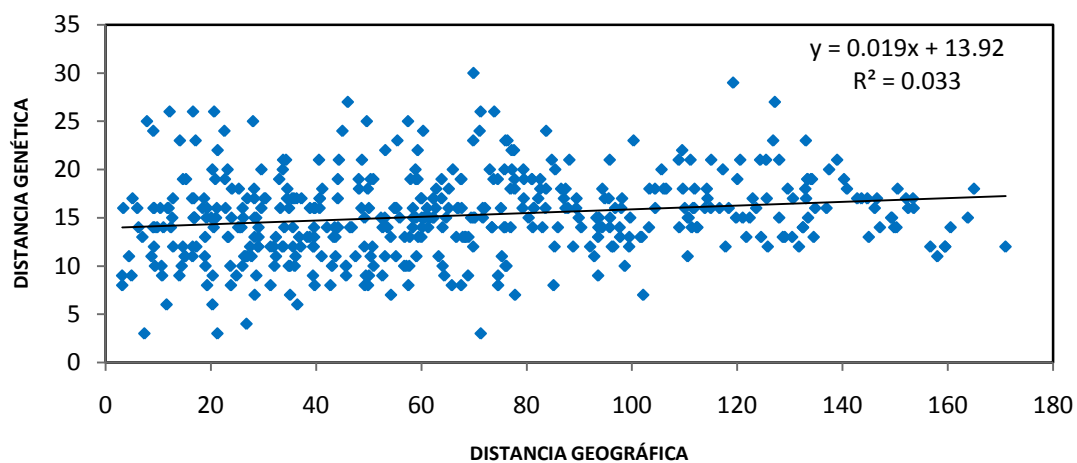
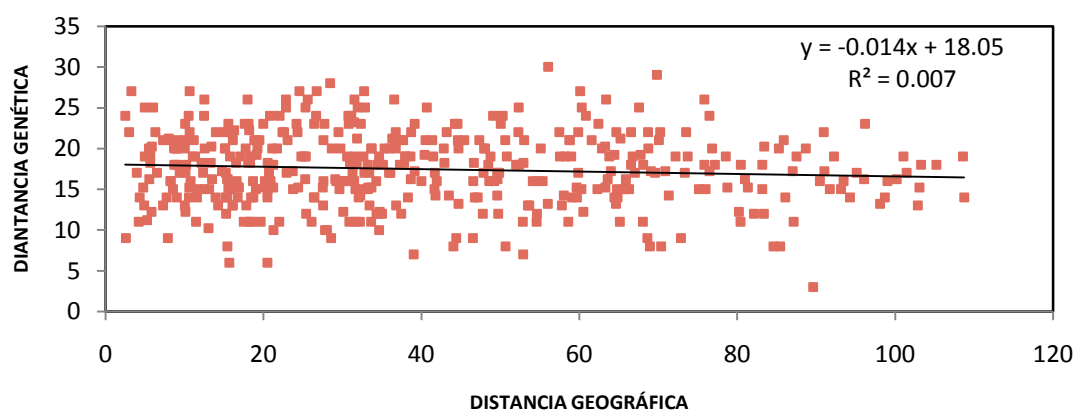
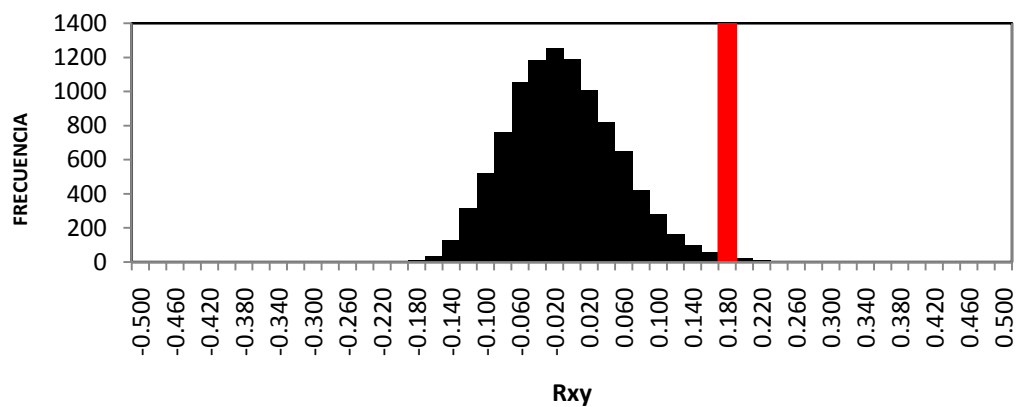
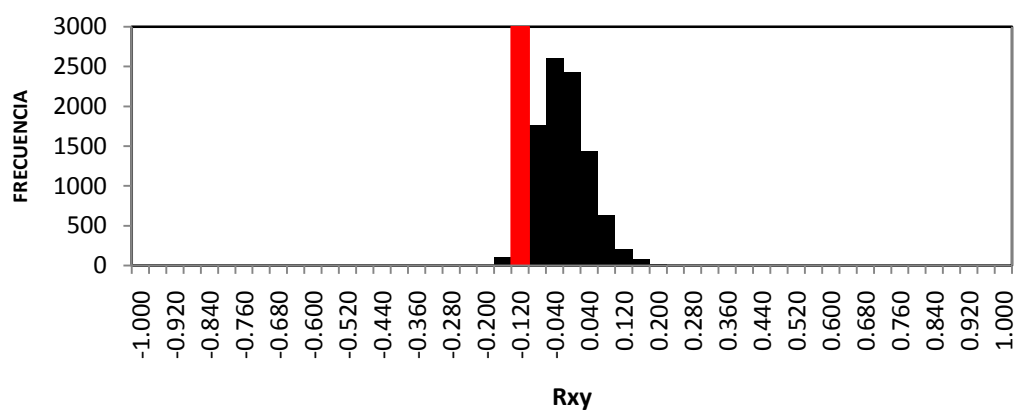
**a.****b.**

Figura 16. Test de Mantel. **a.** San Ignacio. **b.** Rincón Ombú. Las rectas indican la función lineal de Y, con la expresión correspondiente en cada caso.



a.



b.

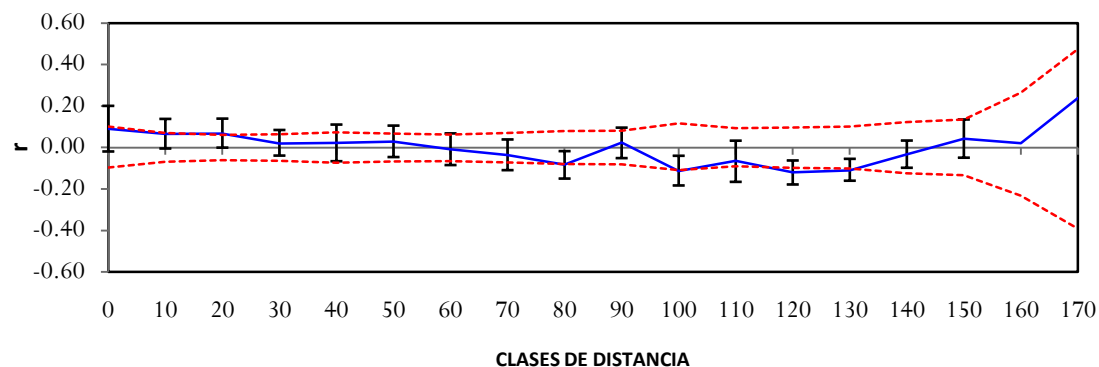
Figura 17. Distribución de frecuencias del Coeficiente de Correlación obtenido a través del test de Mantel luego de 9.999 permutaciones (en negro) vs. el valor calculado a partir de los datos originales (rojo) para **a.** San Ignacio y **b.** Rincón Ombú.

IV.1.3.2.4 Análisis de la estructuración genética espacial a escala local de las poblaciones de *C. brasiliense* estudiadas

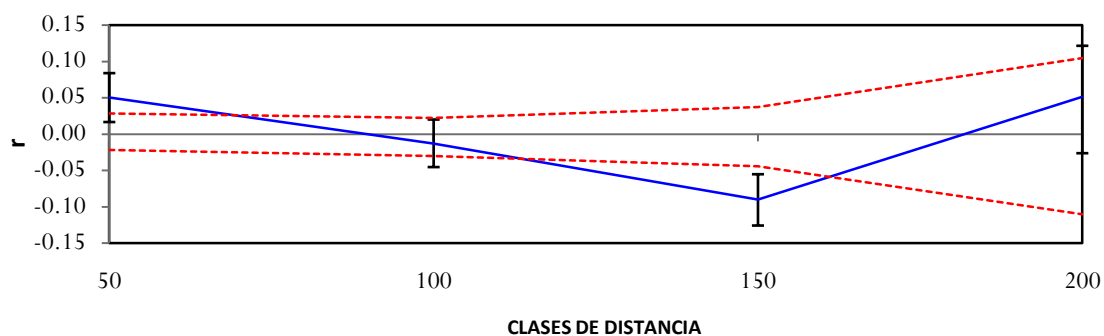
Este análisis determinó la existencia de estructuración en San Ignacio, donde los pares de individuos que distan 20–29 m entre sí se encontraron más relacionados que lo esperado bajo la H_0 (Figura 18a). Asimismo, a partir de la clase de distancia de 80, 100, 120 y 130 m se observaron valores significativos de autocorrelación negativa, indicando que estos pares de individuos mostraron distancias genéticas más grandes que las esperadas por azar. Para descartar que la estructuración genética observada no fuera un artefacto de la clase de distancia, se realizó el análisis con clases de 50, 100 y 200 m, manteniéndose la significancia de la prueba (Figura 18 b y c). En conjunto, el análisis indicó la presencia de algún nivel de estructuración genética espacial, con lo cual la H_0 fue rechazada. Empero, en la población de Rincón Ombú se determinó exactamente la situación contraria, encontrándose todos los valores calculados a partir de las matrices genética y geográfica dentro del intervalo de confianza (95%), por lo que no fue posible rechazar la H_0 , ya que el arreglo de los genotipos en el espacio se distribuye al azar (Figura 18d). Los valores de autocorrelación r significativos obtenidos en SI, los intervalos de confianza y los pares de individuos por cada clase se detallan en la Tabla XXV.

Tabla XXV. Autocorrelación espacial en SI. N° de pares, r e intervalos de confianza (IC) de las clases de distancia en las que se obtuvieron valores significativos.

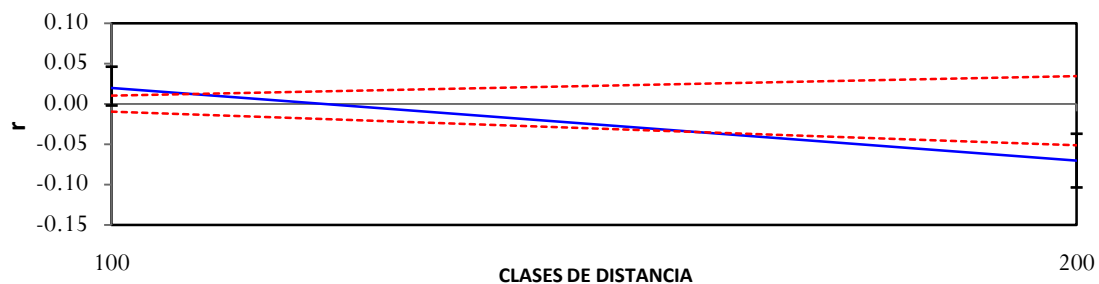
Clase de distancia	20	80	100	120	130
N° de pares	50	28	15	19	18
r	0,068	-0,082	-0,112	-0,119	-0,110
IC 95%	-0,061-0,062	-0,078-0,080	-0,119-0,118	-0,097-0,097	-0,101-0,102



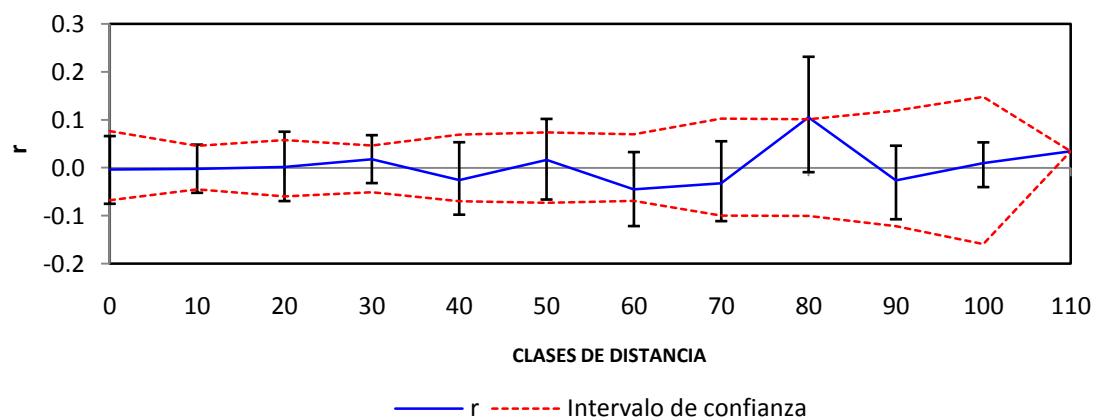
a.



b.



c.



d.

Figura 18. Correlogramas entre distancia genética y espacial calculados con 9.999 permutaciones y un *bootstrapping* de 10.000 remuestreos para **a-c.** San Ignacio, con distinto tamaño de clase de distancia: **a.** 10 m. **b.** 50 m. **c.** 100 m. **d.** Rincón Ombú con clases de distancia de 10 m.

IV.1.4 Amplificación de *loci* SSRs nucleares en poblaciones argentinas de *C. brasiliense*

Los sistemas microsatélites nucleares presentaron dificultades durante su optimización. Para salvarlas, fueron ensayadas diversas condiciones del perfil de ciclado entre las que podemos nombrar: las temperaturas de desnaturalización y *annealing*, los tiempos de desnaturalización, *annealing* y extensión, como así también variaciones en la concentración de los componentes de la reacción principalmente del MgCl₂. No obstante a pesar de las variaciones efectuadas no fue posible optimizar la amplificación en forma satisfactoria para ninguno de los tres pares de *primers* ensayados. En el caso de Cln8 y de Clone 10, no se obtuvieron productos de amplificación, mientras que para el SSR Clm1 se logró un perfil cuasi optimizado (Figura 19). A los efectos de intentar redefinir la secuencia de *primers* para estos microsatélites nucleares, los amplicones de tamaño esperado fueron secuenciados, no obstante no se obtuvieron electroferogramas legibles (Figura 20).

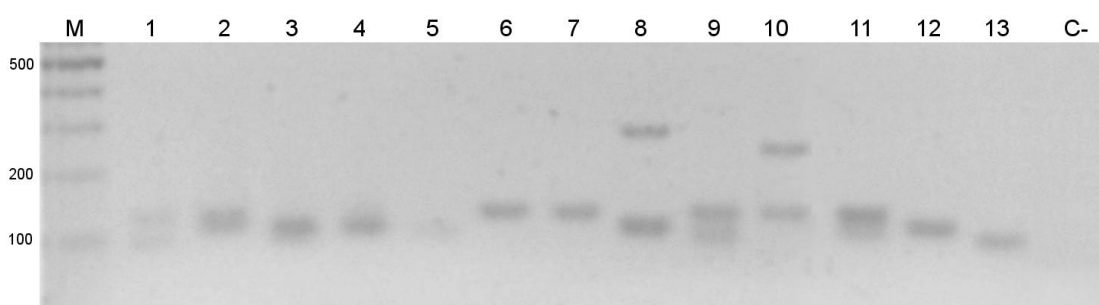


Figura 19. Amplificación del SSR nuclear Clm1 durante la optimización en *C. brasiliense*. **1-13:** Individuos de las distintas poblaciones analizadas. **M:** *ladder* 100 pb Productos Bio-Logicos. **C-:** control negativo.

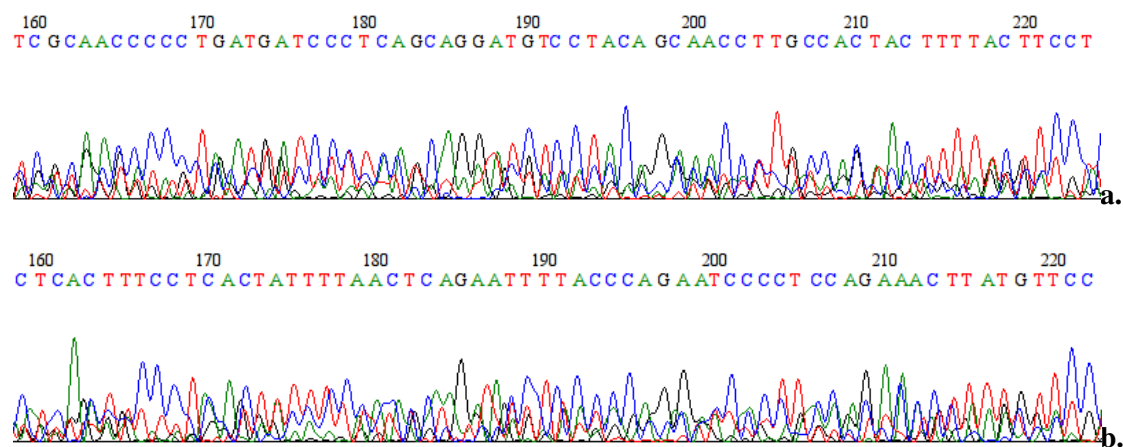


Figura 20. Electroferogramas de amplicones obtenidos con el microsatélite nuclear clm1. **a.** Individuo de la muestra de México. **b.** Individuos de la muestra de Rincón Ombú.

IV.2 Regiones informativas en el genoma cloroplástico de *C. brasiliense*

IV.2.1 Amplificación de regiones microsatélites cloroplásticas

Los cpSSR ccmp2 e intrón del gen *trnL* fueron amplificados en individuos de las seis poblaciones analizadas. En geles de agarosa al 2% fue posible discriminar dos tamaños de bandas para el cpSSR ccmp2 (\approx 240 pb y 220 pb). El primero común a las poblaciones argentinas y paraguayas, y el segundo observado exclusivamente en las muestras provenientes de México.

En el caso del intrón se observó una banda monomórfica de tamaño muy similar al esperado de 700 pb. Algunos individuos presentaron dificultades en la amplificación de esta región, en algunos casos no se registró la amplificación mientras que en otros se presentaron amplicones de masa insuficiente para análisis posteriores. Este inconveniente conllevó al diseño de un par de *primers* internos específicos para *C. brasiliense*, tal como se describirá más adelante en esta sección. Ejemplos de los amplicones obtenidos para cada región microsatélite pueden apreciarse en la Figura 21 a y b.

IV.2.2 Amplificación de regiones intergénicas de ADNcp

Los patrones de amplificación para cinco de las seis regiones intergénicas seleccionadas fueron altamente reproducibles, y al ser referenciados con el marcador de peso molecular, se determinó que los amplicones obtenidos se ubicaban en los rangos de tamaños esperados (Figura 22 a-g). En el caso del par de *primers trnS-trnG* se obtuvo un amplicón de aproximadamente 1300 pb, ilustrado en la Figura 22 c. Sin embargo, el perfil obtenido exhibió la presencia de una banda espúrea de aproximadamente 600 pb, por lo que se ensayó el segundo par de *primers* disponible para esta región que incorporó el intrón del gen *trnG*, con lo que se obtuvo un amplicón de mayor tamaño.

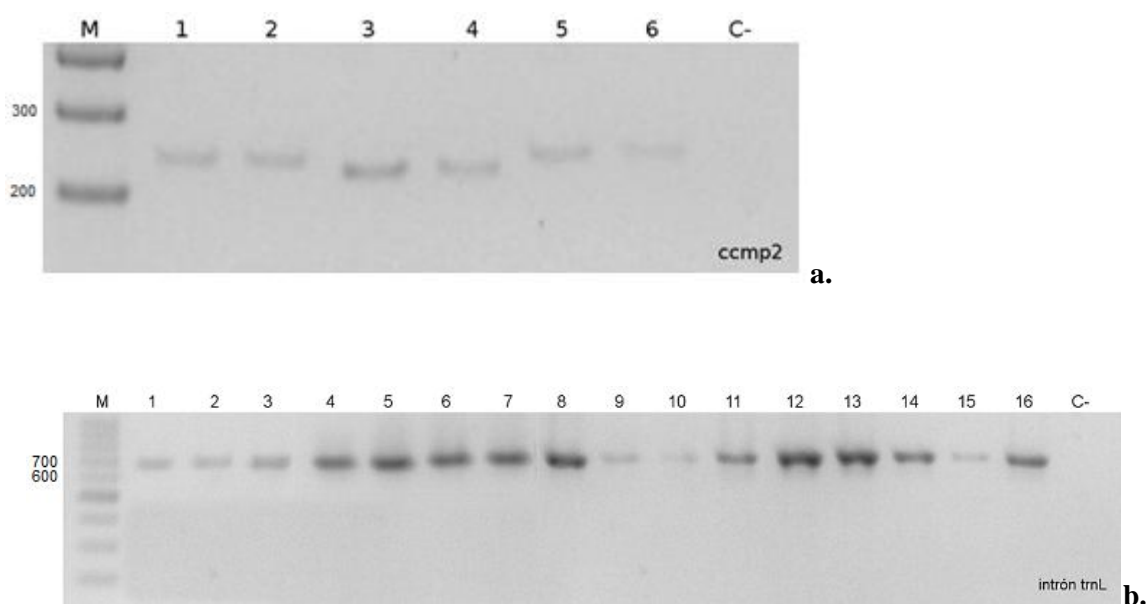


Figura 21. Amplificaciones de SSRs cloroplásticos. **a.***ccmp2*: 1-2, 5-6: poblaciones argentinas y paraguayas. 3-4: población de México **b.** intrón del gen *trnL*: todas las poblaciones analizadas. **M**: 100 pb *ladder* productos Bio-Lógicos. **C-:** Control negativo.

No obstante, este par de *primers* sólo permitió resultados evaluables en unos pocos individuos de cada una de las cinco poblaciones. Cada región cloroplástica analizada y los tamaños obtenidos en cada caso se detallan en la Tabla XXVI.

Tabla XXVI. Tamaño estimado de las regiones intergénicas amplificadas.

Región intergénica	Tamaño del amplicón (pb)
<i>psbC-trnS</i>	1600
<i>trnH-psbA</i>	500
<i>trnS-trnG</i>	1300
<i>trnS-trnG-trnG</i>	2000
<i>psbJ-petA</i>	1500
<i>petG-trnP</i>	500
<i>rpl32-trnL</i>	1100

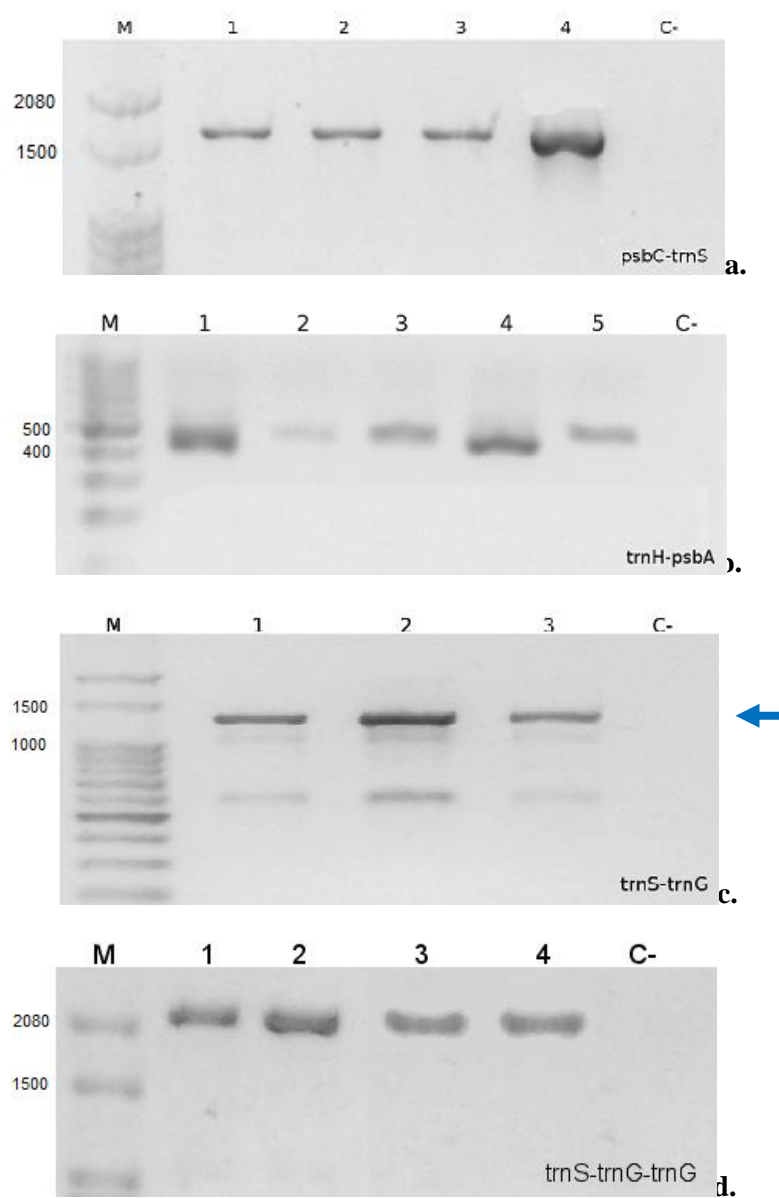


Figura 22. Regiones cloroplásticas intergénicas amplificadas. **a-d:** A la derecha en cada imagen se indica la región amplificada. En **c** la flecha indica el tamaño esperado. 1-5: individuos diferentes de las seis poblaciones analizadas. **M:** 100 pb *ladder* de Productos Bio-Lógicos. **C-:** control negativo.

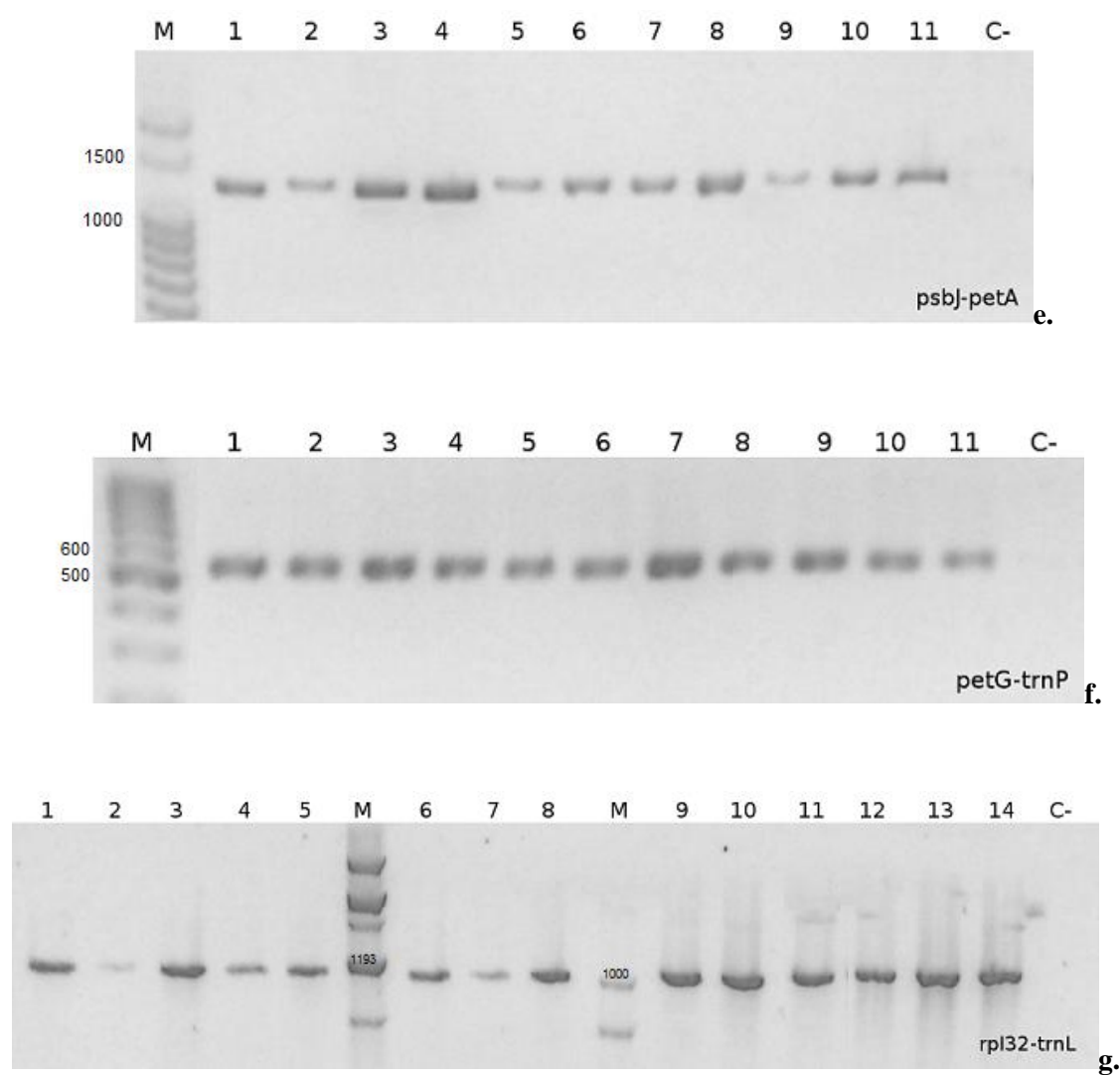


Figura 22 (continuación). Regiones cloroplásticas intergénicas amplificadas. **e-g:** A la derecha en cada imagen se indica la región amplificada. **1-14:** Distintos individuos de las seis poblaciones analizadas. **M:** 100 pb *ladder* de Productos Bio-Lógicos. En **g:** 400 pb *ladder* de Productos Bio-Lógicos y 50 pb *ladder* de Invitrogen. **C-:** control negativo.

IV.2.3 Secuenciación y edición de las regiones cloroplásticas amplificadas

La secuenciación de las distintas regiones amplificadas, tanto SSRs como espaciadores intergénicos, se consiguió con electroferogramas de calidad adecuada en la mayoría de los casos, obteniéndose secuencias a partir de la totalidad de las regiones cloroplásticas y para las seis poblaciones evaluadas, tal cual se ejemplifica en la Figura 23 a y b (en Anexo IV se incluyen las secuencias obtenidas). Entre las regiones que en algunos casos presentaron lecturas superpuestas, poco claras, con pérdida de señal o interrumpidas abruptamente se encuentran las regiones *trnH-psbA*, *trnS-trnG-trnG* y *rpl32-trnL* (Figura 23 c y d).

Las secuencias en su totalidad fueron depuradas con el editor Bioedit (Hall, 1999). Mediante BLASTn se verificó la identidad de cada secuencia, confrontándola con la base de datos del GenBank. En todos los casos los mayores porcentajes de identidad se dieron con especies del mismo género (*Calophyllum inophyllum*, *C. membranaceum*, *C. calaba*, *C. logifolium*, *C. antillanum*), de la misma familia (*Mammea americana*, *M. africana*, *Mesua ferrea*, *Marila laxiflora*) o familias del orden Malpighiales (Clusiaceae: *Clusia* sp., *Garcinia mangostana*, Euphorbiaceae: *Jatropha curcas*, *Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta*; Salicacaceae: *Populus* sp.), como puede apreciarse en la Tabla XXVII. La longitud de la secuencia editada de cada región se detalla en la Tabla XXVIII.

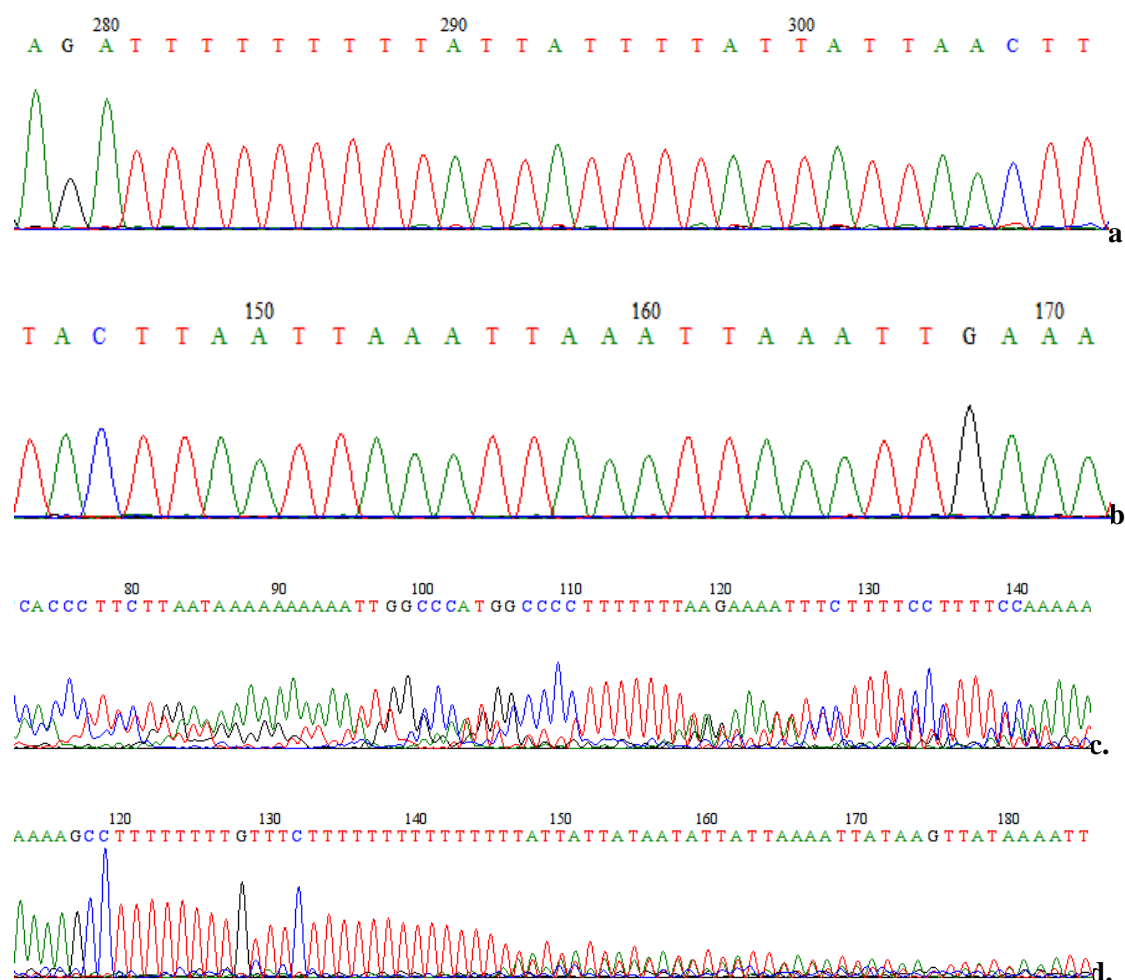


Figura 23. Fragmentos de diferentes electroferogramas que muestran las distintas calidades de secuencias obtenidas. **a.** Región *petG-trnP*. **b.** Región *rpl32-trnL*. **c.** *trnH-psbA*, productos superpuestos. **d.** *psbJ-petA*, caída de la señal de la secuencia con superposición.

Tabla XXVII. BLAST de las secuencias obtenidas con la base de datos GenBank. Se muestran los números de acceso (#), porcentajes de cobertura (C), el valor E* y los porcentajes de identidad (I) de tres de entre los primeros resultados del alineamiento.

Descripción	Familia	#	C (%)	E	I (%)
Intrón del gen <i>trnL</i>					
<i>Calophyllum inophyllum</i>	Calophyllaceae	AB817426.1	90	0,0	98
<i>Senefelderopsis croizatti</i>	Euphorbiaceae	AY794654.1	100	1e ⁻¹⁷⁸	83
<i>Dalembertia populifolia</i>	Euphorbiaceae	AY794651.1	100	4e ⁻¹⁷⁷	83
Ccmp2					
<i>Mallotus paniculatus</i>	Euphorbiaceae	AY159390.1	73	1e-19	77
<i>Rubus fruticosus</i>	Rosaceae	FM174384.1	98	5e-18	73
<i>Hagenia abyssinica</i>	Rosaceae	FM174372.1	98	2e-15	72
<i>psbC-trnS</i>					
<i>Mammea americana</i>	Calophyllaceae	JX662588.1	86	0,0	99
<i>Manihot esculenta</i>	Euphorbiaceae	EU117376.1	100	0,0	93
<i>Hevea brasiliensis</i>	Euphorbiaceae	HQ285842.1	100	0,0	93
<i>trnH-psbA</i>					
<i>Messua ferrea</i>	Calophyllaceae	GQ435381.1	80	7e-72	76
<i>Calophyllum longifolium</i>	Calophyllaceae	GQ982164.1	61	3e-64	80
<i>C. calaba</i>	Calophyllaceae	HM446894.1	61	2e-34	71
<i>trnS-trnG-trnG</i>					
<i>Populus alba</i>	Salicaceae	AP008956.1	51	0,0	85
<i>P. trichocarpa</i>	Salicaceae	AC208093.1	49	0,0	85
<i>Manihot esculenta</i>	Euphorbiaceae	EU117376.1	45	0,0	89
<i>rpl32-trnL</i>					
<i>C. inophyllum</i>	Calophyllaceae	HQ599788.1	100	0,0	95
<i>Ochna serrulata</i>	Ochnaceae	HQ599792.1	69	1e ⁻⁵¹	68
<i>Manihot esculenta</i>	Euphorbiaceae	EU117376.1	54	3e ⁻²⁹	73
<i>psbJ-petA</i>					
<i>Hevea brasiliensis</i>	Euphorbiaceae	HQ285842.1	88	0,0	75
<i>Manihot esculenta</i>	Euphorbiaceae	EU117376.1	92	7e ⁻¹⁷⁸	73
<i>Jatropha curcas</i>	Euphorbiaceae	FJ695500.1	92	1e ⁻¹⁵⁵	72
<i>petG-trnP</i>					
<i>H. brasiliensis</i>	Euphorbiaceae	HQ285842.1	99	4e ⁻¹³²	83
<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	JF937588.1	99	1e ⁻¹²⁶	82
<i>J. curcas</i>	Euphorbiaceae	FJ695500.1	99	7e ⁻¹¹⁶	80

* **Valor E:** probabilidad de obtener el mismo alineamiento por azar. Valores bajos indican que el alineamiento es más verosímil.

Tabla XXVIII. Detalle de la longitud de las secuencias cloroplásticas obtenidas en *C. brasiliense* y para las seis poblaciones analizadas. Se presentan rangos en las que hubo diferencias en la edición o variantes haplotípicas de distinta longitud.

Región	Longitud (pb)
Intrón del gen <i>trnL</i>	611
<i>ccmp2</i>	194
<i>pcbC-trnS-UGA</i>	1.514
<i>trnH-psbA</i>	409
<i>trnS-trnG-trnG</i>	1.897
<i>rpl32-trnL-UAG</i>	811-901
<i>psbJ-petA</i>	1.137-1.174
<i>petG-trnP</i>	449
Longitud total	7.022 - 7.149

IV.2.4 Análisis de secuencias cloroplásticas obtenidas en las diferentes poblaciones de *C. brasiliense* analizadas

IV.2.4.1 Caracterización de secuencias cloroplásticas que exhiben microsatélites

Se determinó la secuencia parcial del intrón del gen *trnL* de *C. brasiliense*, con una longitud total de 611 pb. En todos los individuos y poblaciones se identificaron tres motivos de repetición interrumpidos en la secuencia del intrón: dos mononucleotídicos y uno dinucleotídico (Tabla XXIX). En ninguna de las 43 secuencias analizadas en *C. brasiliense* derivadas de individuos pertenecientes a las poblaciones argentinas, paraguayas y mexicana, se observó el cuarto motivo de repetición descrito para otras especies (Figura 24a). El par de *primers* internos específicamente diseñados para esta región permitió la secuenciación de un

fragmento de 450 pb. La calidad de las amplificaciones obtenidas puede apreciarse en la Figura 25. Por otro lado, esta región mostró sitios variables entre los 43 individuos secuenciados, ubicados por fuera de las variantes repetidas en tándem observadas a lo largo de la secuencia siendo la seleccionada para efectuar el análisis filogeográfico.

En el caso del amplicón obtenido a través de los *primers* ccmp2, éste también presentó un motivo de repetición mononucleotídico interrumpido en las poblaciones argentinas y paraguayas (Tabla XXIX, Figura 24 b). Las muestras mexicanas mostraron una banda de menor tamaño en agarosa al 2%, sin embargo, no fue posible contar con una secuencia de buena calidad, que permitiera verificar si la diferencia de tamaño se corresponde con una variante de esta repetición mononucleotídica, ya que también se identificó un microsatélite imperfecto el que podría ser la causa de la variación observada en el tamaño del fragmento amplificado. La edición de la secuencia resultó en un fragmento de 194 pb, por lo que no cumplió con la longitud mínima requerida por GenBank (≥ 200 pb) para ser depositada en la base de datos.

Tabla XXIX. Descripción de los cpSSRs encontrados en las regiones cloroplásticas analizadas para individuos de la especie *C. brasiliense* pertenecientes a las poblaciones estudiadas.

Región	Número de SSRs	Motivo de Repetición
Intrón del gen <i>trnL</i>	3	(A) ₃ (C) ₂ (A) ₃ C(A) ₃
		(A) ₃ G(A) ₃ GACAG(A) ₂ C(A) ₈
		(TA) ₃ CG(TA) ₃ CA(TA) ₂
ccmp2	1	[(T(A) ₃) ₂ GT(A) ₅]G[(T(A) ₃) ₂ GT(A) ₅]

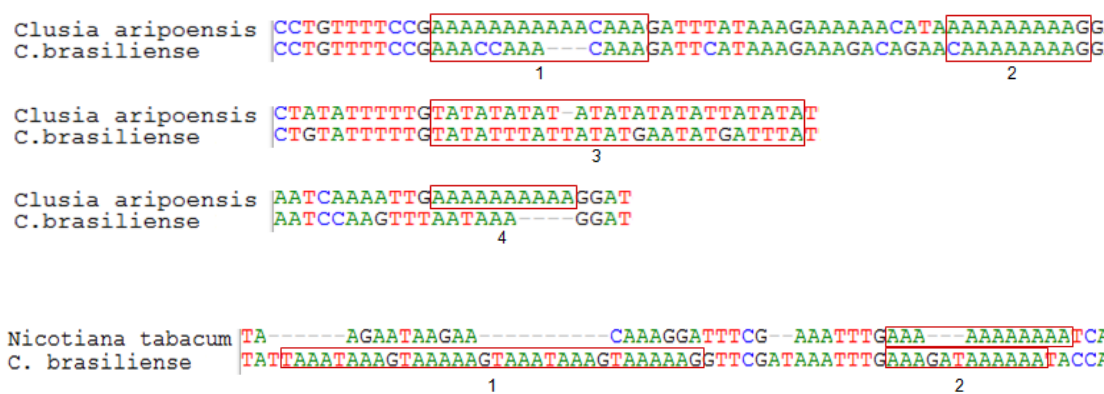


Figura 24. Motivos de repetición de *C. Brasiliense* en las secuencias analizadas. **a. 1-3:** Núcleos de repetición en el intrón del gen *trnL*. **1 y 2:** Repeticiones mononucleotídicas. **3:** Repetición dinucleotídica. **4:** Motivo de repetición no observado en *C. brasiliense*. **b.1:** Motivo de repetición imperfecto observado con el par de *primers* ccmp2 en *C. brasiliense* e inexistente en *N. tabacum*. **2:** Repetición mononucleotídica interrumpida.

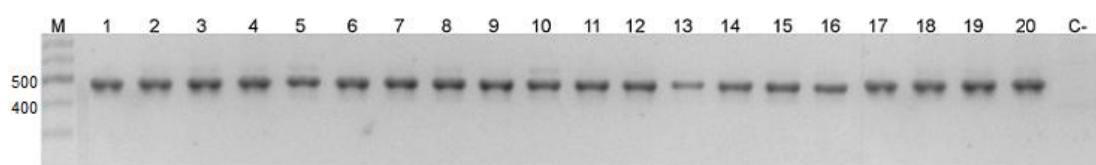


Figura 25. Ejemplos de las amplificaciones del intrón del gen *trnL* en todas las poblaciones con *primers* internos específicos desarrollados en el presente trabajo. **1-4:** SI. **5-8:** PV. **9-11:** IY. **12-14:** RO. **15-16:** AY. **17-20:** MX. **M:** 100 pb *ladder* productos Bio-Lógicos. **C-:** Control negativo.

IV.2.4.2 Obtención de perfiles de restricción en ADN cloroplástico (ADNcp-RFLPs)

IV.2.4.2.1 Selección de endonucleasas de restricción: Análisis *in silico*

La secuenciación de la región *psbC-trnS* de los primeros individuos de San Ignacio y Rincón Ombú permitió la realización de un ensayo de digestión virtual. Como resultado de éste, dos isoesquizómeros se ajustaron a los criterios definidos: *Sau3AI* y *MboI*. Se seleccionó *MboI*, cuyas características se describen en la Tabla XXX. Los sitios de restricción de la

enzima sobre la secuencia obtenida y el perfil de digestión esperado se ilustran en la Figura 26. De esta manera los fragmentos esperados con *Mbo*I fueron un total de 6 de cuyos tamaños aproximados en pb se detallan en la Tabla XXX.

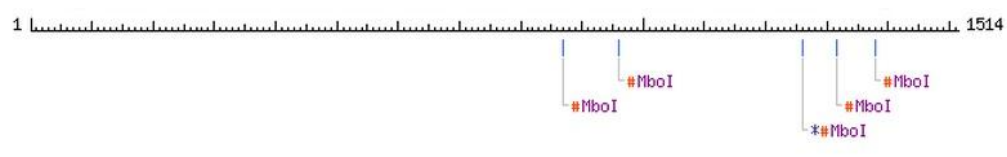
Tabla XXX. Características de la ER *Mbo*I.

Secuencia de reconocimiento	T° de actividad enzimática	Tamaño de los fragmentos esperados
5'...GATC...3' 3'...CTAG...5'	37°C	870pb
		300pb
		134pb
		92pb
		62pb
		56pb

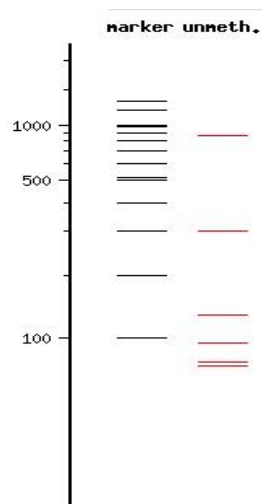
IV.2.4.2.2 Análisis de los perfiles ADNcp-RFLPs

Se logró con éxito la digestión enzimática total de la región *psbC-trnS* con la ER *Mbo*I de todos los individuos pertenecientes a las poblaciones de Rincón Ombú y San Ignacio (Figura 27). Observándose los 3 fragmentos de mayor tamaño esperados, dado el límite de resolución del gel de agarosa utilizado.

La digestión de la región intergénica *psbC-trnS*, con la ER *Mbo*I permitió discriminar un único haplotipo cloroplástico en las dos poblaciones.



a.



b.

Figura 26. a. Sitios de restricción de la ER *MboI* en la región *psbC-trnS*. **b.** Corrida electroforética virtual en gel de agarosa al 2% de la región *psbC-trnS* digerido con la ER *MboI*.

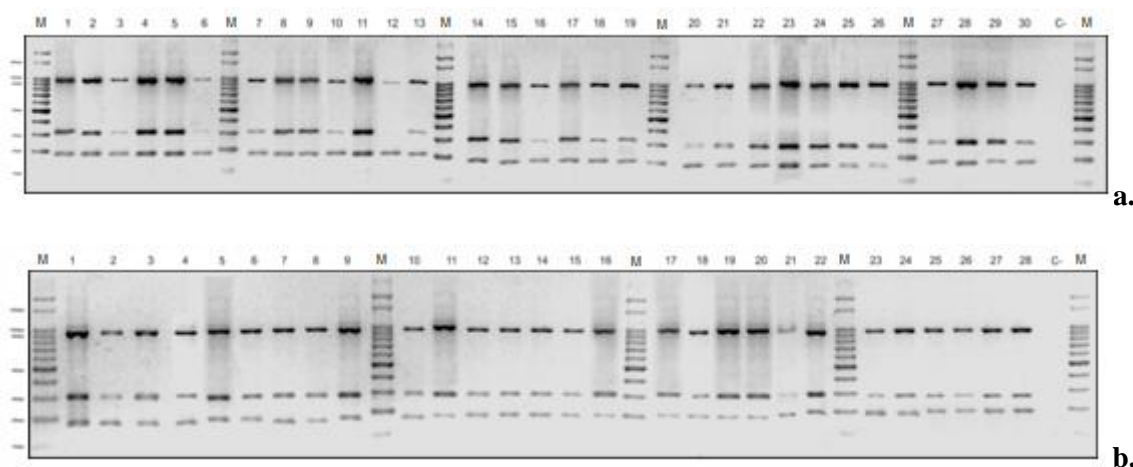


Figura 27. Digestión enzimática de la región *psbC-trnS* con la endonucleasa de restricción *MboI* **a. 1-30:** Individuos de la población de SI (Misiones) **b. 1-28:** Individuos de la población de RO (Corrientes) **M:** 100 pb ladder de Productos Bio-Lógicos. **C-:** control negativo.

IV.2.4.3 Edición y caracterización de secuencias intergénicas obtenidas en *C. brasiliense*

Región *psbC-trnS*: la región *psbC-trnS* secuenciada posee una longitud de 1.514 pb de las que 1.307 pb, en *C. brasiliense*, corresponden al extremo 3' del gen *psbC* que codifica para la proteína *Photosystem II CP43 Chlorophyll Apoprotein* y los 207 pb restantes constituyen la región no codificante de *psbC-trnS*.

Región *trnH-psbA*: esta secuencia evidenció la presencia de varios microsatélites con *cores* de repetición mononucleotídicos, que hicieron que la secuenciación fuera dificultosa (Figura 28). Como resultado, se obtuvieron electroferogramas que permitieron realizar los alineamientos entre algunos individuos, entre los que hubo un 100% de identidad. Sin embargo, esta secuencia no fue incorporada a GenBank hasta no confirmarlas por resecuenciación e incorporación de mayor número de individuos en el análisis de la misma.

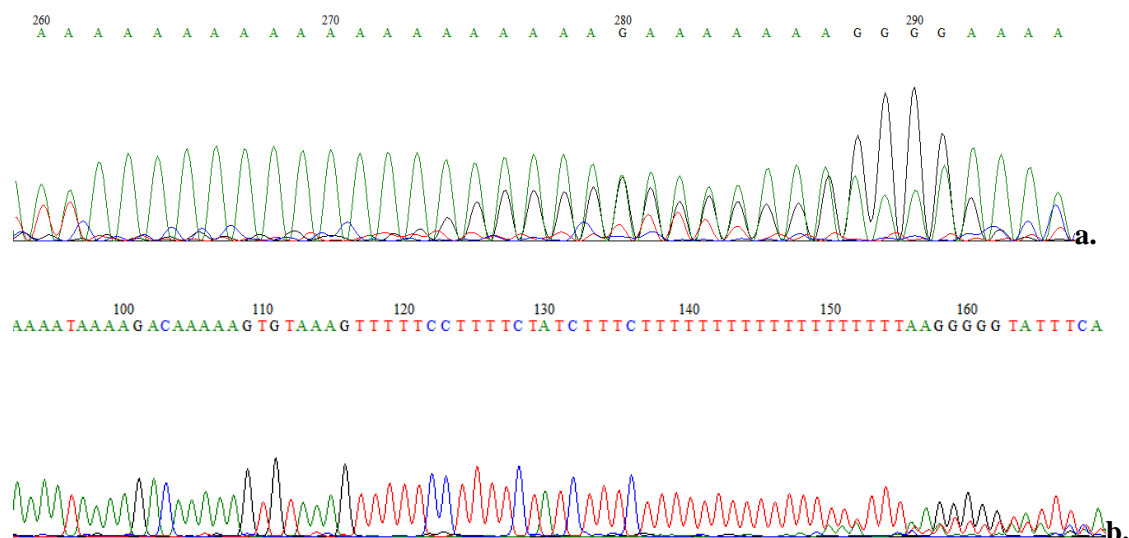


Figura 28. Electroferogramas de la región *trnH-psbA*. **a y b.** e.g cores de repetición mononucleotídica.

Región *trnS-trnG-trnG*: la secuencia consenso de esta región fue editada a partir de un individuo de la Isla Yacyretá. De los pocos individuos secuenciados, en la mayoría de los casos la longitud de las lecturas fueron cortas, no consiguiéndose alineamientos que informaran acerca de los sitios polimórficos que pudieran presentarse.

Región *rpl32-trnL*: como se indicó precedentemente el amplicón obtenido para esta región fue de una longitud total que varió entre 811-901 pb. Resulta interesante que con esta región coamplificó un fragmento de ≈ 500 pb, el que fue observado en todos los individuos y poblaciones analizados (Figura 29 a y b). Frente a esta situación, esta banda espúrea fue también purificada desde el gel de agarosa, con el objeto de verificar su identidad. Al efectuarse el BLASTn de la secuencia obtenida se observó una identidad mayor al 90% con la secuencia del begomovirus *tomato severe rugose virus* (ToSRV) Tabla XXXI. Por su parte, el alineamiento del fragmento esperado mostró un 98 % de identidad con la región *rpl32-trnL* de

Calophyllum inophyllum. En el alineamiento de las secuencias analizadas se observó un motivo de repetición pentanucleotídico (AAATT)_n que mostró dos variantes haplotípicas, discriminando las poblaciones de ARG y PY (haplotipo 1) de las muestras de México (haplotipo 2) descriptos en la Tabla XXXII.

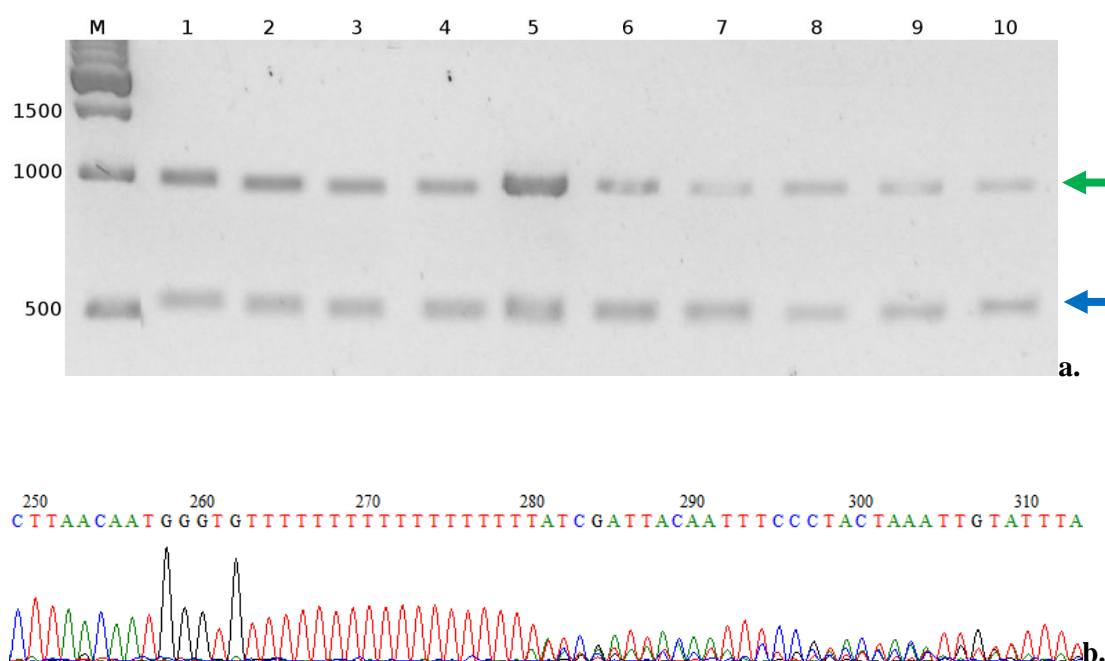


Figura 29. Coamplificación de *rpl32-trnL* con *Tomato Severe Rugose Virus*. **a.** Verificación de purificación de los amplicones de la región intergénica *rpl32-trnL* de las seis poblaciones analizadas. **1-2:** RO. **3-4:** SI. **5:** IY. **6:** AY. **7-8:** PV. **9-10:** MX. **M:** 500 pb ladder Invitrogen. La flecha verde indica la banda de tamaño esperado y la azul la banda espúrea constante en todos los individuos. **b.** electroferograma de la región superpuesta correspondiente a la secuencia de la banda de menor tamaño incluida en la de tamaño esperado.

Región *psbJ-petA*: esta región presentó inconvenientes en la secuenciación con el *primer* *petA*, presentando productos superpuestos y caída de señal de secuencia a partir de los 140 pb en todos los individuos. No obstante, en conjunto con el *primer* sentido, se consiguió una cobertura de casi 1200 pb. Al igual que en la región anterior, el alineamiento de las secuencias disponibles reveló dos haplotipos, diferentes en dos InDels, una sustitución y un cpSSR mononucleotídico (T)_n. El haplotipo 1 fue común a las poblaciones de ARG y PY, mientras que el haplotipo 2 fue común a todas las muestras de México (Tabla XXXIII).

Tabla XXXI. Resultados del alineamiento de la banda espúrea de la región *rpl32-trnL* con GenBank. Se presentan los primeros cuatro resultados, similares a los siguientes 87 registros. #: N° de acceso. C (%): porcentaje de cobertura. E: valor E*. I (%): porcentaje de identidad.

Descripción	#	C (%)	E	I (%)
<i>Tomate severe rugose virus</i>	EU600238.1	98	0,0	93
<i>Tomate severe rugose virus</i>	FJ828808.1	96	0,0	96
<i>Tomate severe rugose virus</i>	JF803261.1	95	0,0	98
<i>Tomate severe rugose virus</i>	DQ207749.1	95	0,0	98

***Valor E:** probabilidad de obtener el mismo alineamiento por azar. Valores bajos indican que el alineamiento es más verosímil.

Región *petG-trnP*: esta región fue una de las dos más cortas, junto con *psbA-trnH*, pero a diferencia de ésta, no presentó dificultades en su secuenciación. Nuevamente, se identificaron dos haplotipos, distinguiéndose las poblaciones de ARG y PY de la de México. En este caso, la diferencia entre los dos haplotipos estuvo dada por una inversión de 8 pb en un único paso mutacional que puede observarse en la Tabla XXXIV. A su vez, la región invertida se encuentra flanqueada por una repetición invertida de 10 pb de longitud, que

favorece la formación de una estructura de tallo y bucle, cuya estructura fue graficada mediante la aplicación on line *DNAfold*¹⁴(Figura 30).

Tabla XXXII. Haplotipos identificados a partir del alineamiento de la región *rpl32-trnL* en *C. brasiliense*. Se muestran únicamente los sitios informativos del alineamiento. También se incorporó *C. inophyllum* (#HQ599788.1) para su comparación en esas posiciones. Los guiones indican *gaps* y los puntos similitud.

Haplotipos	Posiciones nucleotídicas del alineamiento					Poblaciones
	1	1	1	1	1	
	6	6	6	6	6	
	4	5	6	7	8	
H1	A	A	A	T	T	ARG y PY
H2	-	-	-	-	-	MX
<i>C. inophyllum</i>	.	T	.	.	A	-

¹⁴<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>

Tabla XXXIII. Haplotipos identificados a partir del alineamiento de la región *psbJ-petA* en *C. brasiliense*. Se muestran únicamente los sitios informativos del alineamiento. Se incorporó además *Hevea brasiliensis* (# HQ285842.1) para su comparación en esas posiciones. Los puntos indican similitud, los guiones *gaps* y **N** son posiciones desconocidas pues exceden al alineamiento.

Haplotipos		Posiciones nucleotídicas del alineamiento																																						Poblaciones																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla XXXIV. Haplotipos identificados a partir del alineamiento de la región *petG-trnP* en *C. brasiliense*. Se muestran únicamente los sitios informativos del alineamiento. Se incluyó a *H. brasiliensis* (# HQ285842.1) como la clusiácea de mayor similitud en esta región para su comparación en esas posiciones. Los puntos indican similitud, los guiones *gaps*.

Haplotipos	Posiciones nucleotídicas en el alineamiento												Poblaciones				
	0	0	0	0	0	0							0	0	1	1	
	9	9	9	9	9	9							9	9	0	0	
	2	3	4	5	6	7							8	9	0	1	
H1	C	C	T	T	T	C	-	-	-	-	-	-	C	C	G	T	ARG y PY
H2	A	C	G	G	G	A	-	-	-	-	-	-	A	A	G	G	MX
H. brasiliensis	T	T	T	A	A	T	.	.	.	C	-

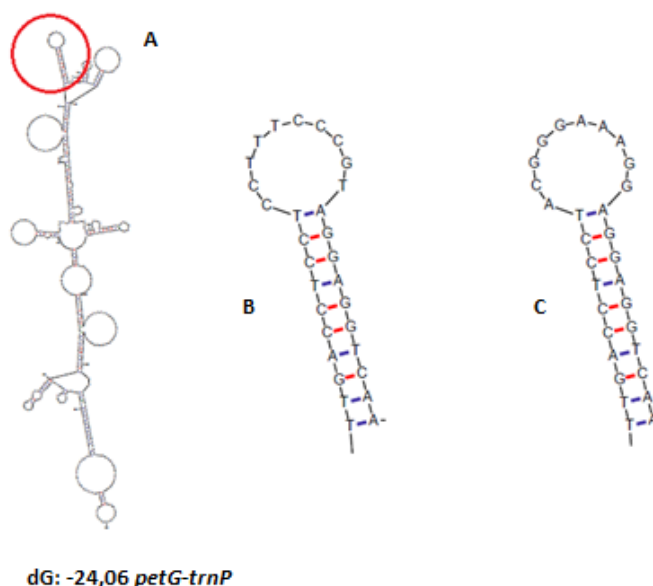


Figura 30. Representación de la estructura de tallo y bucle que comprende la repetición invertida observada en *petG-trnP*. **A.** Estructura más estable de la secuencia de simple cadena. **B.** Tallo y bucle del haplotipo 1, poblaciones de ARG y PY. **C.** Tallo y bucle del haplotipo 2, muestras de MX.

Todas las secuencias mencionadas y descritas en el presente trabajo, y por primera vez para *C. brasiliense*, así como también los haplotipos identificados a partir de los individuos secuenciados hasta el momento fueron incorporados a la base de datos GenBank del NCBI, con los números de acceso detallados en la Tabla XXXV.

IV.2.4.4 Análisis filogeográfico de las poblaciones de *C. brasiliense* estudiadas

El análisis se efectuó a partir del alineamiento de 43 secuencias del intrón del gen *trnL*, amplificadas con el par de *primers* específico, y con una longitud total de 450 pb.

Los sitios polimórficos informativos fueron 4, con dos variantes cada uno (Tabla XXXVI). Cabe aclarar que dos de estos se encuentran en posiciones consecutivas (316 y 317) por lo que podrían corresponder a una inversión que involucró un paso mutacional.

Tabla XXXV. Números de acceso (#) de las secuencias intergénicas descritas para *C. brasiliense* en el presente trabajo.

Región	# GenBank
<i>psbJ-petA_H1</i>	KJ093668
<i>psbJ-petA_H2</i>	KJ093669
<i>pcbC-trnS-UGA</i>	JN368484.1 JN596278.1
<i>petG-trnP_H1</i>	KJ093665
<i>petG-trnP_H2</i>	KJ093666
<i>trnS-trnG-trnG</i>	KJ093667
<i>rpl32-trnL-UAG_H1</i>	KJ093670
<i>rpl32-trnL-UAG_H2</i>	KJ093671

Con respecto a los sitios con *gaps*, los 7 sitios mencionados corresponden a un único InDel del segmento, duplicado en las muestras de MX. La diversidad nucleotídica y haplotípica totales también se informan en la Tabla XXXVI, si bien se encuentran discriminadas por población en la Tabla XXXVII.

Se identificaron tres haplotipos (H1, H2 y H3). El H1 fue observado en todas las poblaciones de distribución sur y constituyó además el único haplotipo hallado en SI, RO, PV y AY. En la IY se encontró una variación intrapoblacional con la presencia de dos haplotipos (H1 y H2) los que se diferencian entre sí por un paso mutacional, no obstante el programa DNASP los trató como sitios independientes. Por su parte los individuos de la población de MX exhibieron también un único haplotipo (H3), que lo separa del H2 por dos nuevas transversiones y un paso mutacional correspondiente al InDel informado. Cada haplotipo fue remitido a GenBank con el número de acceso que se indica a la derecha del alineamiento de los sitios informativos en la Tabla XXXIX.

Tabla XXXVI. Análisis de sitios polimórficos en el intrón del gen *trnL* de *C. brasiliense* de las seis poblaciones analizadas en el presente trabajo.

Parámetro	Cantidad
Sitios con <i>gaps</i>	7
Sitios monomórficos	439
Sitios polimórficos	4
Sitios no informativos o <i>singletons</i>	0
Sitios informativos o parsimoniosos	4
Dos variantes	4 (293, 316, 317, 416)
Haplotipos (h)	3
Diversidad haplotípica (Hd)	0,286 (0,081)
Diversidad nucleotídica (π)	0,00237 (0,00068)

Tabla XXXVII. Parámetros de diversidad estimados. *N*: n° de individuos. *S*: sitios segregantes. *H*: haplotipos/n° de individuos.

Población	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>H</i>	π	<i>Hd</i>
SI	11	0	H1	0,0000	0,000
RO	11	0	H1	0,0000	0,000
PV	11	0	H1	0,0000	0,000
IY	3	2	H1/2, H2/1	0,0301	0,667 (0,314)
AY	2	0	H1	0,0000	0,000
MX	6	0	H3	0,0000	0,000

Los valores de diferenciación poblacional se encontraron entre 0 y 1, tal como se describen en la Tabla XXXIX. Para una mejor visualización las muestras de IY y AY se agruparon como una única población denominada PY, mientras que PV, RO y SI se integraron como ARG.

Tabla XXXIII. Haplotipos identificados a partir del alineamiento del intrón del gen *trnL* en *C. brasiliense*. Se muestran únicamente los sitios informativos. También se incorporó *C. inophyllum* (# AB817676.1) para su comparación con los haplotipos encontrados. Los puntos indican similitud y los guiones *gaps*.

Haplotipos	Posiciones nucleotídicas en el alineamiento														Poblaciones	#
	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4		
	7	9	1	1	3	3	3	3	3	4	4	8	1			
	5	3	6	7	5	6	7	8	9	0	1	1	6			
H1	G	G	T	C	-	-	-	-	-	-	-	T	T		ARG y PY	KF854307
H2	G	G	G	A	-	-	-	-	-	-	-	T	T		IY	KF854308
H3	G	T	G	A	T	A	C	A	A	A	A	T	G		MX	KF854309
<i>C. inophyllum</i>	T	T	G	A	T	A	C	A	A	A	A	C	.		-	-

Tabla XXXIX. Índices F_{ST} de diferenciación poblacional.

	Poblaciones			
		ARG	PY	MX
	ARG	0,00	0,00	1,00
	PY	0,00	0,00	0,75
	MX	1,00	0,75	0,00

Los test de neutralidad se realizaron únicamente en las poblaciones de PY tratadas como un único grupo (IY + AY) por ser la que exhibió más de un haplotipo. Ambos test no fueron significativos para $p < 0,01$, indicando que las diferencias nucleotídicas encontradas se ajustan al modelo de evolución neutral y no se relacionan con eventos demográficos pasados. El valor de los estadísticos y sus intervalos de confianza se describen en la Tabla XL.

Tabla XL. Test de neutralidad efectuados a partir de las secuencias del intrón del gen *trnL* de *C. brasiliense*.

Test de neutralidad	Valor	Intervalo 99% de confianza
Tajima's D	0,31826	-1,85076 – 2,83370
Fu's F_S	2,099	-4,84068 – 7,10335

La relación entre los haplotipos identificados a partir de la región del intrón del gen *trnL* puede visualizarse en el árbol filogenético construido mediante máxima parsimonia (Figura 31), en el cual se incluyó la secuencia intrónica de *Calophyllum inophyllum* para otorgarle direccionalidad a las diferencias nucleotídicas observadas en las secuencias.

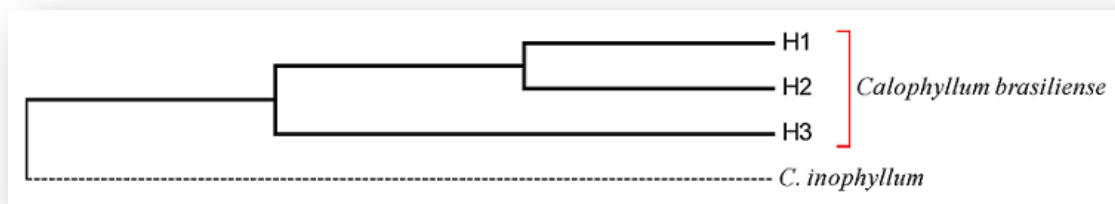


Figura 31. Árbol filogenético de los haplotipos hallados en las poblaciones de *C. brasiliense* estudiadas y para la región intrónica del gen *trnL*.

La frecuencia de cada haplotipo y las poblaciones en las que cada uno está presente se muestra en la red de haplotipos elaborada con el programa Network 4.611 (Figura 32). En este caso, las poblaciones paraguayas de AY e IY fueron incorporadas como una única población dada su proximidad geográfica.

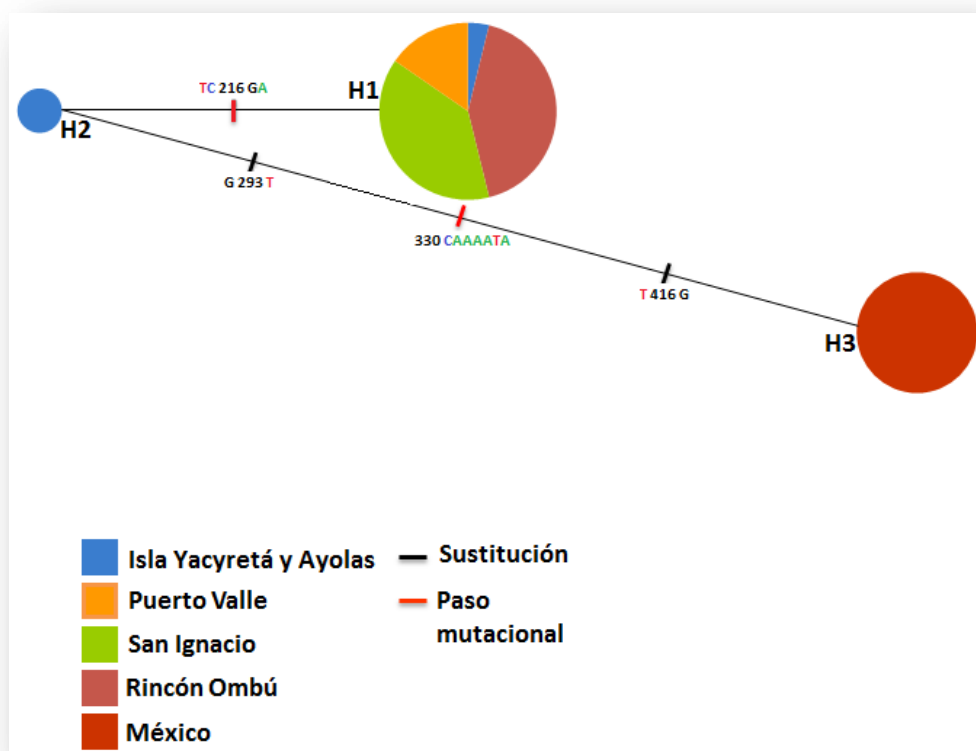


Figura 32. Rede de haplotipos obtenida a partir de la secuencias del intrón del gen *trnL* de *C. brasiliense* en las poblaciones de ARG (SI, RO y PV), PY (IY y AY) y MX.

IV.2.4.5 Esquematización de las regiones de ADNcp de *C. brasiliense* analizado en el presente trabajo

Las secuencias del ADNcp de *C. brasiliense* obtenidas sumaron un total de 7.149 pb. Cuando se adicionaron las secuencias nucleotídicas disponibles en GenBank (HQ331550.1: gen *matK*; JQ591094.1: gen *rbcL*; HQ331853.1: gen *ndhF*) la longitud ascendió a 9.529 pb, que representa $\approx 6\%$ de la longitud total del ADNcp, proporción estimada tomando como referencia el tamaño de la mayoría de los genomas cloroplásticos de angiospermas disponibles en GenBank, comprendidos entre 135 y 160 Kb (Downie & Palmer, 1992).

Los genomas plastidiales taxonómicamente más cercanos a *C. brasiliense* que han sido completamente secuenciados son cuatro: *Jatropha curcas* (NC_012224.1), *Manihot esculenta* (NC_010433.1), *Populus alba* (NC_008235.1) y *P. trichocarpa* (NC_009153.1), todas éstas pertenecientes al orden Malpighiales. En la Figura 33 puede observarse la ubicación más probable de las regiones secuenciadas para *C. brasiliense* tomando como referencia el mapa físico del genoma cloroplástico de *Jatropha curcas*.

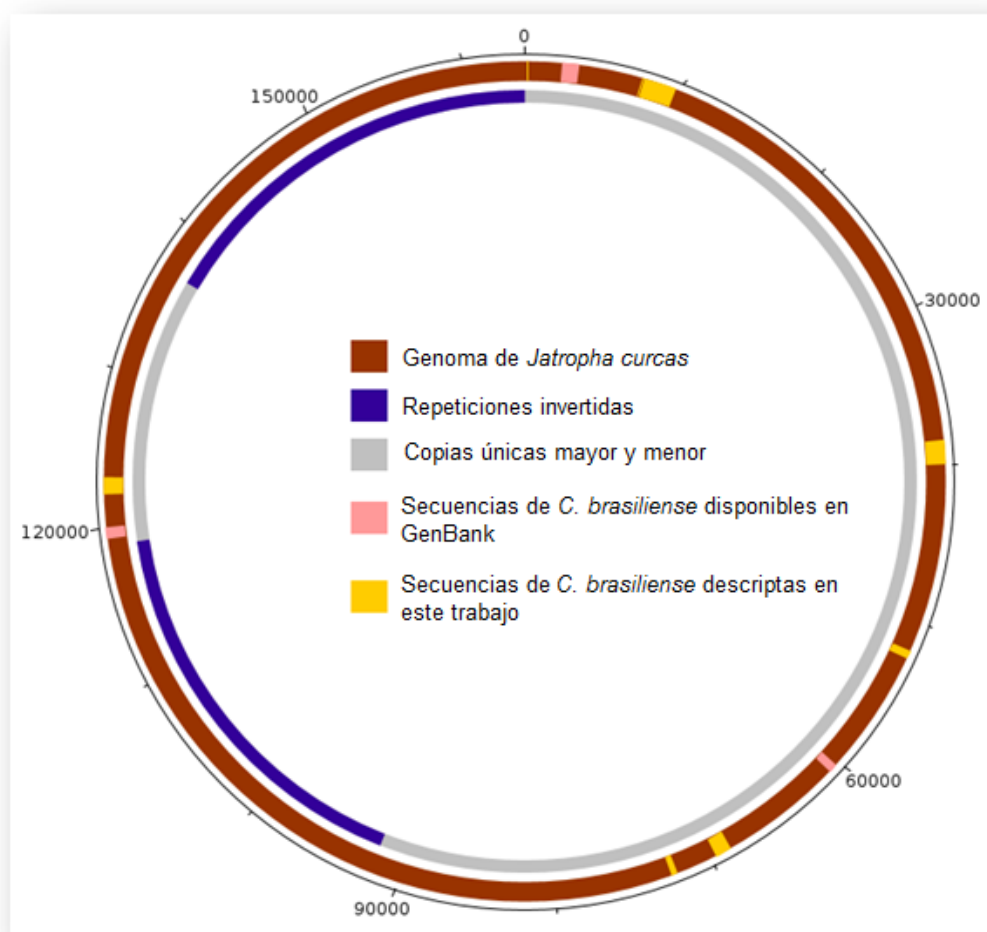


Figura 33. Representación gráfica de las secuencias del ADN cp de *C. brasiliense* con referencia al genoma de *Jatropha curcas* (NC_012224.1).



V.Discusión

V. Discusión

V.1 Caracterización genética de poblaciones argentinas de *C. brasiliense* mediante marcadores nucleares

Los marcadores RAPDs han sido utilizados extensamente para la caracterización genética de un gran número de especies de plantas (Fernandes de Souza *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Chhipi Shrestha *et al.*, 2013; Inoue *et al.*, 2013). A pesar de la desventaja que representa la naturaleza dominante de estos marcadores y la criticada reproducibilidad de la técnica, constituyen una alternativa importante para el estudio de numerosas especies arbóreas tropicales poco estudiadas, para las cuales no se dispone de marcadores codominantes (Fernandes de Souza *et al.*, 2012). Mientras que el desarrollo de marcadores de esta clase insume un tiempo considerable, la técnica de RAPDs permite realizar una primera caracterización genética rápida, posibilidad que fue especialmente valorada en el caso de las poblaciones de *C. brasiliense* en las localidades de San Ignacio en Misiones y en el Refugio Rincón Ombú en Corrientes, dada su situación de riesgo local. Estas dos poblaciones fueron afectadas por inundaciones permanentes, como consecuencia de la suba progresiva de la cota de la represa hidroeléctrica Yacyretá, inundando gran parte de las comunidades de selvas ribereñas. Arif *et al.* (2010) resaltan el valor de esta herramienta molecular en genética de poblaciones, especialmente en la determinación de la diversidad en especies endémicas o raras en riesgo de extinción. Particularmente, en este trabajo se obtuvieron 56 *loci* RAPDs a partir de los cuales se estimaron parámetros poblacionales que fueron capaces de brindar información acerca de la variabilidad genética existente en dos poblaciones del extremo sur de la distribución geográfica actual de *C. brasiliense*, integrantes de las comunidades ribereñas del Río Paraná a la altura de la localidad de San Ignacio y Rincón Ombú.

Los parámetros poblacionales estimados en el presente trabajo contribuyen al conocimiento de la distribución de la variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones. Los valores que toman estos estimadores están asociados a distintas variables, entre éstas características inherentes a la biología de la especie tales como el sistema reproductivo, la duración del ciclo de vida, el estatus sucesional, el mecanismo de dispersión de semillas y la extensión de la distribución geográfica (Nybom & Bartish, 2000); al mismo tiempo son importantes las características propias de cada población, la estructura y dinámica, y el tamaño, entre otras. La comunidad acompañante y los factores abióticos: composición del suelo, disponibilidad de nutrientes y heterogeneidad ambiental, también pueden influir en la distribución de la variabilidad genética (Degen *et al.*, 2001). En consecuencia, cuando se interpretan y cotejan resultados, son innúmeras las variables que contribuyen al parámetro observado. Por otro lado, al momento de establecer comparaciones y argumentar posibles explicaciones del patrón de variabilidad encontrado, se debe tener presente que cada análisis tiene particularidades relacionadas con procedimientos metodológicos, como la estrategia de muestreo, el tamaño de la muestra en cada población y la cantidad de marcadores empleados (Nybom & Bartish, 2000).

El diseño de muestreo definido en el presente trabajo se pensó considerando las generalidades que han mostrado los estudios moleculares en especies arbóreas tropicales. Entre éstas, la mayoría concentra altos porcentajes de variabilidad dentro de las poblaciones en comparación con especies de zonas templadas, tal es el caso de *Eugenia dysenterica*, *Trichilia pallida* y *Aspidosperma polyneuron* (Zucchi, 2002; Zimback *et al.*, 2004; Domingues *et al.*, 2005). Dado que la variación entre poblaciones es baja, entonces la colección de un gran número de individuos (idealmente 30 o más) en unas pocas poblaciones

naturales es una técnica relativamente efectiva para visualizar la variabilidad genética subyacente en estas especies (Muchugi *et al.*, 2008).

Respecto al número de marcadores obtenidos (56 *loci*) y empleados para realizar el presente análisis poblacional se encuentra en el rango recomendado por Nybom & Bartish (2000). Estos autores han compilado y analizado más de 100 publicaciones relacionadas con análisis genético-poblacionales de poblaciones de plantas basados en RAPDs, encontrando un promedio de 71 marcadores. En su trabajo además mencionan que la estimación de diferenciación interpoblacional se mantiene estable entre 5 y 20 marcadores según datos simulados por Isabel *et al.* (1999) mientras que la diversidad genética intrapoblacional no decrece significativamente a partir de 30 marcadores RAPDs (Aagard *et al.*, 1998). Sin embargo, recomiendan emplear al menos 50 *loci* RAPDs para disminuir los desvíos estándares y contrarrestar distorsiones que podrían generarse al incorporar algunos *loci* de evolución sujeta a selección natural así como *loci* de genomas citoplasmáticos, artefactos imposibles de poner en evidencia mediante la utilización de la técnica seleccionada.

De esta manera, el número de marcadores obtenido representa el máximo que pudo emplearse para realizar el análisis ya que de todos los *primers* disponibles, tanto sean RAPDs o ISSRs, solo se consiguieron perfiles reproducibles en tres de estos. En este sentido, es importante resaltar que en la población derivada de la localidad de San Ignacio se observó el mayor grado de amplificación. Probablemente este inconveniente esté directamente relacionado con la calidad de ADN obtenido. Así, la escasa amplificación observada en la población de Rincón Ombú, puede ser adjudicada por ejemplo a la presencia de compuestos que pudieran estar inhibiendo parcial o totalmente la reacción de amplificación. Como dato ilustrativo es importante resaltar que la población de RO fue la que más impactada se

encontraba, lo que tal vez provocó cambios fisiológicos en estos individuos. Muchugi *et al.* (2008) destacan que la imposibilidad de obtener extractos de ADN de calidad adecuada es un factor limitante importante en la aplicación de marcadores moleculares en especies tropicales, especialmente debido a que éstas difieren notablemente en su bioquímica, incluso dentro del mismo género, lo cual hace necesario ajustar un protocolo para cada taxón. Pandey *et al.* (1996) comprobaron que los polisacáridos ácidos afectan el rendimiento enzimático y sugieren la incorporación de *enhancers* de la *Taq* polimerasa a la mezcla de reacción, citando DMSO, PEG400 y Tween 20. En la literatura se encuentran numerosos principios activos de *C. brasiliense* aislados de distintos órganos de la planta, muchos de ellos polifenólicos (Buffon Isaías, 2004), que podrían actuar como inhibidores, por lo que siguiendo el protocolo de extracción de ADN escogido en este trabajo se incorporaron cuatro compuestos antioxidantes (DIECA, PVP, ácido ascórbico y b-mercaptoetanol) en el buffer de digestión, luego de ensayarse varios protocolos a fin de optar por el más apropiado para la especie (Percuoco, 2007). Además, en las reacciones de PCR se emplearon albúmina de suero bovina (o BSA) y betaína (trimetilglicina, $C_5H_{10}NO_2$) con el fin de incrementar el rendimiento de la polimerasa, sin lograr resultados satisfactorios, no obstante el agregado de BSA mejoró en algunos casos el rendimiento de las amplificaciones. Pandey *et al.* (1996) asimismo sugirieron la dilución de las muestras de ADN, con el objeto de disminuir también la concentración de moléculas inhibitoras; esta estrategia fue también utilizada en el presente trabajo que junto a las anteriormente citadas permitió finalmente obtener los 56 *loci* a a partir de los cuales se estimaron los parámetros poblacionales.

Una vez estimadas las frecuencias génicas para cada *loci* (Tabla XX), se obtuvo el valor de heterocigocidad esperada (*He*), parámetro equivalente a la diversidad génica insesgada de Nei (1978). Los valores de 0,250 en SI y 0,296 en RO fueron equiparables con

estimaciones de la *He* en poblaciones de *C. brasiliense* publicadas hasta el momento, todas éstas en territorio brasileño, entre la que podemos citar la descrita por Galvão, en el año 2006, donde informa valores de *He* de 0,341 y 0,357 para dos poblaciones del estado de Minas Gerais caracterizadas mediante marcadores RAPDs. De igual forma Carnavale-Bottino en 2006 dio a conocer estimaciones de *He* para otras cuatro poblaciones, tres de los estados brasileños de Pará, Rio de Janeiro y Minas Gerais, y una de Costa Rica, analizadas a través de AFLPs, las que mostraron valores entre 0,190 y 0,320. A estos análisis basados en marcadores dominantes se suman otros tres realizados con datos obtenidos a partir de sistemas isoenzimáticos. Las mismas poblaciones estudiadas por Galvão (2006) fueron analizadas a través de electroforesis de isoenzimas (Botrel *et al.*, 2006), presentando *He* de 0,131 y 0,112, valores francamente menores a los obtenidos con RAPDs. Por su parte, De Souza *et al.* (2007) encontraron valores de *He* iguales a 0,430 y 0,438 en dos poblaciones, coincidentemente del estado de Minas Gerais, pero de localización diferente a las anteriores. La caracterización genética de poblaciones brasileñas de *C. brasiliense* más reciente comprende nueve poblaciones del estado de Santa Catarina, las que presentaron estimaciones de la *He* en el rango 0,095 – 0,175 al ser analizadas mediante isoenzimas, siendo éstas las poblaciones brasileras más australes que han sido analizadas hasta el momento (Santos da Silva, 2011). De la comparación de los datos, surgen coincidencias entre los valores obtenidos con los mismos marcadores, lo cual permite inferir que los valores encontrados en el presente trabajo para las poblaciones argentinas, indican menor diversidad genética que las analizadas en Minas Gerais (Galvão, 2006), representando estos datos los primeros para poblaciones de *C. brasiliense* del límite sur de distribución de la especie. En otras especies tropicales se han obtenido resultados similares como por ejemplo en *Aspidosperma polyneuron*, donde seis fragmentos forestales en el estado de Paraná (Brasil) mostraron una *He* media de 0,299. Por su parte, Zucchi (2002)

obtuvo una media de 0,195 en 10 poblaciones de *Eugenia dysenterica* del estado de Goiás (Brasil).

Otra medida de la diversidad genética ampliamente utilizada en la caracterización de las poblaciones de plantas (Bussell, 1999; Gillies *et al.*, 1999; Galvão, 2006; Schlag & McIntosh, 2012) es el índice de diversidad de Shannon (I). Este índice, propuesto para estimar la cantidad de información en el marco de la teoría homónima, pertenece al campo de la ingeniería de la información. Después que Lewontin (1972) utilizó la expresión matemática de I para estimar la diversidad génica, fue empleado en múltiples trabajos de genética de poblaciones (Isabel *et al.*, 1995; Wolff & Richards, 2010; Arias *et al.*, 2012). Más allá de su extensa y aceptada aplicación, en términos de información genética, no es claro el significado del valor absoluto que resulta del cálculo. En consecuencia, la comparación entre los valores de I entre poblaciones de distintas especies carece de significado biológico (Nei, 1975). Sin embargo, por el mismo motivo, su validez no está restringida al supuesto de poblaciones en equilibrio de Hardy-Weinberg, siendo ésta una ventaja ya que la condición de equilibrio es violada por poblaciones pequeñas (Lynch & Milligan, 1994). En el caso de las poblaciones analizadas en este trabajo, los valores de diversidad de SI (0,372) y de RO (0,427) se ubican por debajo de 0,530 y 0,538, estimados en las poblaciones analizadas mediante RAPDs en Brasil (Galvão, 2006), sugiriendo la existencia de menor diversidad génica dentro de las poblaciones argentinas respecto de aquellas.

La comparación de ambas poblaciones argentinas de *C. brasiliense* se realizó, en primer lugar a través de la distancia genética de Nei(D), la que arrojó un valor de 0,185, representando el valor máximo hallado entre poblaciones de *C. brasiliense*, superando incluso a la encontrada entre tres poblaciones brasileñas y una de Costa Rica ($D=0,150$) (Carnavale-

Bottino, 2006). A su vez, la distancia genética encontrada representa una de las más elevadas descritas en la literatura para poblaciones de especies arbóreas tropicales. Como ejemplo podemos citar el trabajo de Russell *et al.* (1999) quienes estudiaron poblaciones de *Calycophyllum spruceanum*, una especie arbórea que ocupa planicies inundables de la cuenca del Amazonas, encontrando distancias genéticas que se ubican en el rango comprendido entre 0,020 – 0,103.

De esta manera y en un todo de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, el 72% de la variabilidad genética observada en las poblaciones de *C. brasiliense* argentinas, se distribuye dentro de las mismas mientras que el 28% restante corresponde a la variabilidad interpoblacional existente. En concordancia, el análisis realizado por Galvão (2006) en las poblaciones brasileiras de Minas Gerais reveló porcentajes prácticamente idénticos (71% y 29% respectivamente). De igual forma, estudios realizados en poblaciones naturales de la especie arbórea *C. spruceanum* mostraron que el 91% de la varianza se encuentra dentro de las poblaciones (Russell *et al.*, 1999). Sorprendentemente, Carnavale-Bottino (2006) halló tan solo un 63% de variación intrapoblacional cuando analizó 514 *loci* AFLPs en cuatro poblaciones de *C. brasiliense*, tres de los estados brasileños de Pará, Rio de Janeiro y Minas Gerais, y una de Costa Rica, con distancias geográficas de entre 300 y 5.400 km. Por su parte, el valor de diferenciación genética ϕ_{PT} (0,283) estimado a partir del AMOVA para las poblaciones de San Ignacio y Rincón Ombú resalta que estas dos poblaciones argentinas presentan una gran diferenciación genética, según las categorías definidas por Wright en 1978 para el estadístico análogo, F_{ST} ($\leq 0,05$: diferenciación desestimable; 0,05-0,15: diferenciación moderada; $\geq 0,25$: diferenciación elevada). Coincidentemente, Galvão (2006) obtuvo un valor de 0,295 en el análisis de las dos poblaciones de *C. brasiliense* que oportunamente analizara con el mismo tipo de marcadores

utilizados en el presente trabajo. Esta clase de hallazgos es comúnmente observada en especies tropicales, donde en la mayoría de los casos se ponen de manifiesto altos patrones de diferenciación genética. Como ejemplo podemos citar el estudio realizado en 10 poblaciones de *Eugenia dysenterica*, donde se estimó un valor de ϕ_{PT} de 0,32 (Zucchi, 2002), en caso de *Aspidosperma polyneuron*, donde los valores superaron el 0,05 en todos los casos (Domingues *et al.*, 2005), siendo éste el límite inferior a partir del cual Wright (1978) infiere que las poblaciones se encuentran altamente diferenciadas. Dando sustento al presente análisis de diferenciación interpoblacional, el análisis de componentes principales realizado en el presente trabajo a partir de los 56 *loci* de *C. brasiliense* estudiados en sendas poblaciones argentinas, las discrimina notablemente (ver Figura 14).

La evaluación de estructuración espacial de los genotipos mostró la existencia de autocorrelación espacial únicamente en la población San Ignacio. De igual manera, sólo una de las poblaciones analizadas por Galvão (2006) alcanzó valores significativos en el análisis de correlación genética y geográfica. Una diferencia notable entre ambos análisis es el tamaño de los fragmentos selváticos donde se encuentran las poblaciones analizadas, mucho mayores en el caso de las brasileñas, según se deduce de las clases de distancia empleadas en el análisis. Este dato no representa un detalle menor por cuanto el tamaño de las poblaciones limita y define directamente el tamaño de las clases de distancia que se emplearán para realizar la evaluación. Las poblaciones de Brasil permitieron evaluar la estructuración dentro de clases de 224 m, mientras que para las poblaciones argentinas se emplearon clases de 10 m dado las pequeñas áreas que ocupan estas poblaciones.

El correlograma entre las matrices genética y geográfica de la población de San Ignacio mostró valores significativos ($p < 0,05$) para 5 clases de distancia: 20, 80, 100, 120 y

130, indicando que el tamaño de los parches de genotipos no distribuidos al azar tienen a lo sumo 20 m de diámetro. Por el contrario, la probabilidad de que individuos que distan al menos 80 m entre sí guarden una distancia genética mayor a la esperada por azar es alta. De esta forma, el valor descrito en el presente trabajo debe ser tomado en consideración a los fines de definir estrategias para la conservación de estas poblaciones, las que han sido fuertemente afectadas por la suba del nivel del embalse de la represa Yacyretá. Para el caso de la conservación *in situ*, este dato representa un aporte importante para cuando se pretenda definir la extensión del área que será protegida mientras que en el caso de conservación *ex situ*, es un dato relevante al momento de efectuar recolecciones de semillas y frutos. Por su parte, el trabajo de Galvão (2006) recomienda respetar, con fines conservativos de la biodiversidad, una distancia mínima de 443 m, distancia difícil de trasladar a las poblaciones argentinas teniendo en cuenta el tamaño natural que las mismas presentan y resaltado previamente (ver Ítem I.5.2 en Introducción).

El valor de autocorrelación significativo encontrado para la clase 20-29 m ($r=0,068$) presenta escasa diferencia con el límite del intervalo de confianza calculado (-0,061-0,062), sugiriendo estructuración genética débil. En este sentido, Vekemans & Hardy (2004) señalan, en referencia a la interpretación de correlogramas, que el valor crítico hasta el cual se presume estructura genética espacial puede confirmarse si este valor se mantiene al considerar clases de distancia mayores. Esta situación se dio en la población de SI, donde se dispusieron clases de 50 y 100 m, manteniéndose la significancia de la prueba (ver Figura 18 a-c). En aras de robustecer los resultados, los mismos autores instan a incrementar el tamaño muestral y el número de marcadores, demostrando que tiene mayor efecto el aumento del tamaño muestral (e.g. $N>100$). El efecto se debe a que aumenta la proporción de pares de individuos en las clases de distancia. En relación a esto, en SI el mínimo de 30 pares por clase (Doligez & Joly,

1997; Degen *et al.*, 2001) se cumplimenta en la clase con autocorrelación positiva (50 pares en SI), aunque no en las clases con autocorrelación negativa significativa (28, 15, 19 y 18 pares). Probablemente el análisis de un mayor número de individuos tornará más evidente la estructuración genética. En RO, este criterio se cumple hasta la clase 7 (60-69 m). No obstante, en términos reales, no sería posible en las poblaciones argentinas, ya que se han visto notablemente disminuidas por causa de las inundaciones (Figura 34).



Figura 34. Situación de las poblaciones argentinas de *C. brasiliense* analizadas en la ribera del río Paraná luego de las inundaciones. **a.** Población de Rincón Ombú. **b.** Población de San Ignacio.

En general, es común observar mayor estructuración espacial en especies tropicales respecto de la observada en aquellas especies que se distribuyen en zonas templadas (Dick *et al.*, 2008). Entre los factores que contribuyen a la estructuración espacial se encuentran los polinizadores y los agentes dispersores. Se ha descripto que *C. brasiliense* es polinizada por abejas (Fischer & Dos Santos, 2001). Sin embargo, la polinización biológica suele ser menos eficiente que la mediada por el viento, por lo que muchas especies tropicales presentan sistemas de reproducción mixtos como estrategia para asegurar el éxito reproductivo. Tal es el

sistema reproductivo de *C. brasiliense* (Reitz, 1978), por cuanto la autofecundación podría explicar, en parte, la estructuración encontrada. En este sentido, la identificación de porcentajes moderados de semillas vanas recolectadas en la población de San Ignacio (*Claudia Sorol, comunicación personal*) podría interpretarse como consecuencia del aumento de la endogamia favorecido por la autogamia. En un estudio metapoblacional de *Symphonia globulifera* (Clusiaceae) se encontró un 26% de autofecundación en los individuos en zonas de pasturas en contraste con sólo el 10% en remanentes de selva y 9% en selvas continuas demostrando que ante la disminución de polinizadores, las especies tropicales hacen uso de esta alternativa reproductiva (Aldrich *et al.*, 1998). Sin embargo, un mecanismo de dispersión de semillas eficiente puede prevenir la cercanía de genotipos emparentados. En el caso de *C. brasiliense*, los murciélagos asimismo han sido mencionados como los dispersores primarios, y en forma secundaria el transporte por el agua (Passos & Graciolli, 2004; Fischer & Dos Santos, 2001; Marques & Fischer, 2009). Empero, las consecuencias de cada uno de estos factores sobre el grado de estructuración genética difieren. A saber, en el análisis de los patrones de estructuración de 8 especies arbóreas tropicales, Degen *et al.* (2001) mencionan que los murciélagos en conjunto con el fenómeno de gravedad son capaces de transportar más allá de 30 m las semillas de *S. globulifera*, favoreciendo así la distribución aleatoria de los genotipos. Por otro lado, *Carapa procera*, *Moronobea coccínea* y *Vouacapoua americana* son tres de las especies analizadas por Degen *et al.* (2001) cuya dispersión primaria se produce por la acción de la gravedad, y en forma secundaria sus semillas son dispersadas por pequeños roedores dentro de los 50 m. Sin embargo, la acción de los dispersores no impide la estructuración espacial que mostraron las tres especies, demostrando que existen diferencias en la efectividad de la dispersión, que parece variar en función de la vagilidad de los agentes dispersores. Asimismo, la ecología de los agentes dispersores también se relaciona con el

éxito del proceso de dispersión. Marques & Fischer (2009) estudiaron los efectos de dos especies de murciélagos sobre la dispersión y la germinación de *C. brasiliense* en São Paulo (Brasil), concluyendo que no influyen mayormente en la dispersión, pero favorecen notablemente el éxito de la germinación actuando como despulpadores de los frutos. La estructuración genética también puede estar relacionada con la resolutiveidad de los marcadores empleados, como ejemplo la especie *S. globulifera*, que no presentó índices de autocorrelación significativos en el estudio realizado por Degen *et al.* (2001) a través de RAPDs, exhibió una débil estructuración en un análisis posterior efectuado a partir de SSRs por el mismo grupo de trabajo (Degen *et al.*, 2004).

Si bien no existe una correspondencia directa entre agentes dispersores y estructuración espacial, por ser el resultado de la compleja dinámica de cada comunidad, es posible esbozar una explicación de lo observado en las poblaciones analizadas en el presente trabajo. Es posible que la población de *C. brasiliense* emplazada en la localidad de San Ignacio se encuentre genéticamente estructurada debido a la acción de la gravedad. Los frutos son drupas y tienden a caer debajo de sus parentales; la gravedad en combinación con el agua de las lluvias y de las inundaciones periódicas favorecen la acumulación de las semillas en grupos situados en los sitios bajos más cercanos, que a diferencia de Rincón Ombú, presenta pendientes lo suficientemente inclinadas como para permitir el transporte y el depósito de las semillas en estos acúmulos. Sin embargo, la estructuración encontrada es débil, por lo que es plausible suponer que podrían existir otros dispersores que forman parte de la comunidad y contrarrestan el efecto de la pendiente. Ejemplos de estas situaciones se ilustran en las clusáceas *Moronobea coccínea* y *S. globulifera*, donde los frutos son dispersados por pequeños roedores, y en el caso de *S. globulifera* además por murciélagos y mamíferos arbóreos de hábito nocturno (Hardy *et al.*, 2006). Si bien no están registradas las especies de

murciélagos que habitan en estas comunidades ribereñas se ha observado que las especies tropicales no poseen especificidad de polinizadores y dispersores, sino que dependen de las comunidades de cada sitio (Degen *et al.*, 2004). Insectos y picaflores que forman parte de la fauna regional probablemente ejercen el rol de polinizadores, mientras que mamíferos arborícolas, pequeños roedores y numerosas aves podrían actuar como agentes dispersores en las poblaciones de *C. brasiliense* analizadas.

A diferencia de San Ignacio, la población de Rincón Ombú no presenta pendientes pronunciadas, lo que explicaría la ausencia total de estructura genética en las primeras clases de distancia. Por otro lado, no existen registros que confirmen efectivamente la presencia de posibles agentes dispersores en ambos sitios. A su vez, la población de Rincón Ombú presenta una densidad 4,2 veces mayor que San Ignacio, factor que favorece la disposición al azar de los genotipos (Degen *et al.*, 2004; Percuoco *et al.*, 2009).

Los resultados del análisis de autocorrelación espacial indican que las poblaciones contienen la mayor variabilidad genética circunscripta a su interior, por lo que se debería muestrear un número considerable de individuos para asegurar la representatividad de cada población. Sumado a ello, en San Ignacio existe una distancia mínima de 20-29 m entre individuos para prevenir el muestreo de genotipos relacionados. Por otro lado, si se desea que los genotipos estén menos relacionados que por azar, entonces la distancia a respetar debería ser mayor a los 80 m. No obstante, en el trabajo a campo se presentan situaciones que impiden que se cumplan a rajatabla estas recomendaciones. Un claro ejemplo de ello lo respresenta la población de San Ignacio, donde únicamente se han identificado 9 individuos que producen frutos, algunos muy cercanos entre sí (*Claudia Sorol, comunicación personal*).

El análisis realizado en el genoma nuclear se ha limitado a marcadores dominantes. Una fortaleza de los marcadores empleados es la amplia cobertura del genoma que poseen (Domingues *et al.*, 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos deben ser comparados con marcadores codominantes, a fin de confirmar la estructuración genética informada. Los marcadores codominantes ensayados en este trabajo fueron los microsatélites nucleares (SSRs). La característica de hipervariabilidad distintiva de estos marcadores les confiere la propiedad de ser especie-específicos y por ello han de desarrollarse para cada taxón investigado en base a su secuencia. La metodología convencional de obtención involucra básicamente la construcción de bibliotecas genómicas, identificación de SSRs mediante hibridación con sondas, enriquecimiento de las regiones repetitivas, purificación y secuenciación (Litt & Luty, 1989; Rassmann *et al.*, 1991; Zane *et al.*, 2002). No obstante es importante recordar que el genoma de las plantas tiene una frecuencia relativamente más baja de microsatélites que el de especies animales, por cuanto presenta problemas técnicos para el aislamiento de SSRs a gran escala. Además, el tipo más abundante de SSR en plantas, los dinucleótidos A-T, son difíciles de aislar de las bibliotecas debido a que generalmente son palindrómicos (Powell *et al.*, 1996).

Zane *et al.* (2002) enumeran varias alternativas para evitar el “screening” de bibliotecas genómicas en búsqueda de SSRs, las que utilizan marcadores RAPDs, ISSRs y AFLPs como métodos de enriquecimiento de regiones repetitivas (Lunt *et al.*, 1999; Lian *et al.*, 2001; Zane *et al.*, 2002). No obstante, se trata de una técnica onerosa y que demanda mucho tiempo, pero es imprescindible contar con información de secuencia de la especie en estudio, lo cual no es común en especies arbóreas tropicales. Según un censo realizado por Arias *et al.* (2012), hasta el año 2012, únicamente habían sido secuenciados los genomas de *Carica papaya* (Ming *et al.*, 2008) y *Theobroma cacao* (Argout *et al.*, 2010), a los que se han

sumado pocos proyectos más. En los últimos años, el avance vertiginoso que permitió un verdadero ahorro de tiempo en combinación con la obtención de un alto número de SSRs se produjo con el advenimiento de las nuevas tecnologías de secuenciación. De esta manera, muchos autores han conseguido identificar con éxito un gran número de microsátélites a través de las tecnologías de secuenciación conocidas como *Next Generation Sequence* o NGS (Tuskan *et al.*, 2004, Abdelkrim *et al.*, 2009; Santana *et al.*, 2009; Allentoft *et al.*, 2009; Castoe *et al.*, 2010). Sin embargo, en el caso de *C. brasiliense* no se han desarrollado hasta el momento estos marcadores, por lo que en el presente trabajo se intentó obtenerlos por la técnica de amplificación interespecífica haciendo uso de *primers* heterólogos desarrollados en especies emparentadas, teniendo presente que de conseguir amplicones analizables, los patrones generados deben ser analizados con cautela, y de ser posible confirmados mediante secuenciación. De los tres SSRs ensayados, tan solo uno presentó productos semejantes a los perfiles de amplificación esperados. No obstante, no representaron regiones repetitivas en tándem al ser secuenciadas, por lo que fueron desestimados. Estos fracasos pueden ser explicados por la misma estrategia escogida para la obtención de SSRs en *C. brasiliense*, con la que no siempre se logra el éxito esperado en todos los casos. Frente a estos resultados se proyecta utilizar la tecnología de NGS para poder aislar SSRs *de novo* en *C. brasiliense*, que permita confirmar los resultados observados.

V.2 Evaluación de regiones cloroplásticas en las poblaciones de *C. brasiliense* analizadas

El uso de regiones de ADNcp no codificantes con el objeto de realizar inferencias filogeográficas es ampliamente utilizado en estudios poblacionales. Sin embargo, existe un acuerdo en reconocer que cada región tiene características propias según el grupo taxonómico que se esté considerando (Grivet *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2005). En este sentido, la selección

de regiones de ADNcp que permitan realizar análisis intraespecíficos merece tener en cuenta al menos dos consideraciones. En primer lugar, el genoma cloroplástico es extremadamente conservado a nivel de especies, al menos en la mayoría de las regiones comúnmente utilizadas para este tipo de análisis. No obstante, existen otras regiones que exhiben mayor grado de variabilidad, poco exploradas y por ende de uso poco extendido (Shaw *et al.*, 2007). En segundo lugar, es conveniente hacer uso de todas las ventajas que ofrece el análisis previo de las regiones mediante softwares y bases de datos nucleotídicos (*e.g.* GenBank) para realizar la elección de las regiones más adecuadas según el taxón investigado.

A la fecha del presente trabajo, las secuencias de regiones cloroplásticas de *C. brasiliense* disponibles en la base de datos del GenBank eran únicamente tres genes: *matK* #HQ331550.1 y *ndhF* #HQ331853.1 secuenciados a partir de ejemplares de Puerto Rico y el gen *rbcL* #JQ591092.1 obtenido de muestras de Costa Rica, por cuanto al corresponder a regiones génicas del genoma cloroplástico, ninguna se corresponde con las ocho descritas en este trabajo.

Para la obtención de las regiones de ADNcp intergénicas e intrónica en los individuos pertenecientes a las poblaciones bajo estudio, se emplearon en primer lugar cebadores universales. La optimización de la reacción para cada una de las regiones presentó distintos desafíos y dificultades, teniendo en cuenta que, si bien el genoma cloroplástico se caracteriza por su alto grado de sintenia (Grivet *et al.*, 2001), cada especie difiere en la secuencia primaria del ADNcp. De esta manera, por ejemplo, la región *trnS-trnG* presentó productos inespecíficos, siendo amplificada con un segundo par de cebadores disponibles para resolver este conflicto. Asimismo, la región *psbC-trnS* obtenida en todos los individuos analizados en *C. brasiliense* se correspondió en su mayor parte con la secuencia del gen *psbC*, estando

consecuentemente sujeta a presión de selección (Gielly & Taberlet, 1994; Kelchner, 2000) condicionando la obtención de variantes haplotípicas. En este sentido, Forrest *et al.* (2004) han informado por ejemplo, la ausencia de variantes haplotípicas intraespecíficas en un microsatélite cloroplástico potencial (cpSSR) de tipo (T)_n localizado en la región *psbC-trnS*, en un estudio que incluyó 10 poblaciones europeas de *Spiranthes romanzoffiana* (Orchidaceae). A diferencia de la uniformidad encontrada en *C. brasiliense*, Ramos *et al.* (2007) seleccionaron esta región como la más variable entre nueve espaciadores intergénicos, identificando 23 haplotipos distribuidos en 17 poblaciones de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae) de la Provincia del Cerrado en Brasil.

Del conjunto de regiones intergénicas analizadas, las tres que permitieron poner en evidencia variantes haplotípicas en *C. brasiliense* fueron *rpl32-trnL*, *petG-trnP* y *psbJ-petA*. En estas tres regiones las variantes consistieron en InDels que involucraron un paso mutacional, sumándose una sustitución nucleotídica y la presencia de un microsatélite cloroplástico en la última, lo que permitió discriminar las poblaciones de *C. brasiliense* de distribución extrema sur (argentinas y paraguayas) respecto de las muestras derivadas de una población de distribución extrema norte, muestra proveniente de la población de México localizada en el Parque Ecológico Jaguaroundi, municipio de Coatzacoalcos, estado de Veracruz.

El tipo de mutaciones que se seleccionan para reconstruir la historia filogeográfica de un taxón implica considerar sus características y la posibilidad de que sean homoplasias, lo cual lleva a cometer errores en la interpretación de las redes de haplotipos y árboles filogenéticos. Los marcadores más proclives a surgir en forma paralela en linajes independientes son los cpSSRs, y algunos autores han considerado inapropiado su uso para

estudios filogeográficos, excluyendo las frecuentes repeticiones mononucleotídicas poliA/T del análisis (Huang *et al.*, 2004; Lihová *et al.*, 2009). Los InDels cortos (1-10 pb) son comunes en los genomas organelares de las plantas, representando el 25-50% de las mutaciones en regiones no codificantes. Su origen se atribuye al deslizamiento (tartamudeo o *slippage*) de la polimerasa durante los procesos de replicación o de reparación del ADN. Este tipo de InDels fue observado en las regiones *rpl32-trnL* y *psbJ-petA* de *C. brasiliense*. En cambio, en la región *petG-trnP* se observó una pequeña inversión (8 pb) flanqueada por repeticiones invertidas que favorecen la formación de un tallo de 10 pb de longitud, conformando probablemente una estructura de tallo y bucle durante eventos de recombinación intramolecular. Estas inversiones han sido informadas para otras regiones intergénicas e intrónicas y se estima que son lo suficientemente frecuentes como para generarse en forma independiente provocando paralelismos evolutivos (Kelchner & Wendel, 1996; Petit & Vendramin, 2007).

Los tres espaciadores intergénicos descritos en el presente trabajo no han sido utilizados con frecuencia en la literatura analizada hasta el momento. Si bien en las poblaciones argentinas y paraguayas permitieron identificar un único haplotipo, Huang *et al.* (2004) encontró cuatro sustituciones en la región *petG-trnP* y 3 InDels + 1 inversión de 11 pb en la región *psbJ-petA*, con las que pudieron determinar 9 haplotipos en el análisis filogeográfico de *Trochodendron aralioides*, estudiando 4 individuos de cada una de 24 poblaciones de Taiwán y Japón. Por su parte, Hwang *et al.* (2003) informaron la presencia de 28 haplotipos a partir de la secuencias de un intrón y tres regiones intergénicas, entre éstas *petG-trnP*, en un análisis que involucró 17 poblaciones de *Cunninghamia konishii* y 14 de *C. lanceolata*, estando el haplotipo ancestral representado en el 75% de las muestras, resaltando el alto grado de conservación del ADNcp.

En el caso de la región *rpl32-trnL*, ésta fue empleada por Lihová *et al.* (2010), aportando 36 sitios polimórficos en *Cardamine scutata* (Brassicaceae), que en conjunto con una segunda región intergénica, determinaron 36 haplotipos en 46 poblaciones asiáticas. Por su parte, Sugahara *et al.* (2011) identificaron 10 haplotipos en 55 poblaciones de la especie arbórea *Aesculus turbinata* (Hippocastanaceae) secuenciando los espaciadores *rpl32-trnL* y *rpoB-trnC*. Los diez haplotipos difirieron en uno o dos pasos entre sí, y la mayoría de las poblaciones presentó un único haplotipo, indicando baja diversidad genética. Ya sea a nivel de especie como de género este espaciador fue empleado con éxito en varios trabajos conocidos a partir de 2007 siempre en combinación con otras regiones cloroplásticas (Sosa *et al.*, 2009; Gutiérrez-Rodríguez *et al.*, 2011) y genes ribosomales nucleares (Murillo-A *et al.*, 2012), lo que es casi una norma en estudios filogeográficos de plantas, para aumentar la resolución del ADNcp.

Sorprendentemente en *C. brasiliense*, la región *rpl32-trnL* coamplificó una secuencia que mostró identidad casi completa (98%) con el *Begomovirus Tomate Severe Rugose Virus* (ToSRV) (ver Figura 29). El género *Begomovirus* pertenece a la familia de virus de plantas Geminiviridae, están constituidos por ADN circular de simple cadena, que en el caso de *Begomovirus*, se caracteriza por ser generalmente bipartito. Este virus es transmitido por la mosca blanca *Bemisia tabaci*, polífago de distribución geográfica mundial, capaz de infectar a más de 30 familias de plantas reconocidas hasta el momento (Zuñiga-Vega & Ramírez, 2002). En Sudamérica, el ToSRV, causante de pérdidas en cultivares de tomate, representa el 61% de los *Begomovirus* (Fernández Rausch *et al.*, 2008) y ha sido informado en otras especies tales como *Capsicum baccatum* y *Nicandra physaloides* (Bezerra-Agasie *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2009). En el caso de *C. brasiliense*, no existen registros previos de la presencia de este virus, asimismo no fue informado cuando se analizó la región *rpl32-trnL* en otras especies

arbóreas mencionadas anteriormente. Esta situación puede deberse, al menos, a dos razones: (a) el *ToSRV* realmente no estaba presente en las especies analizadas o (b) estaba presente y la banda que así lo demostraba fue desestimada, actitud que es frecuentemente adoptada en el laboratorio ante la presencia de amplicones no esperados.

Sumado a este hallazgo, es interesante resaltar que la secuencia encontrada se corresponde con la secuencia total del *ToSRV*, y se caracteriza por ser monopartita, resultado compartido únicamente con el primer registro del alineamiento mostrado (ver Tabla XXXI). Interesantemente, Morales & Anderson (2000) mencionan que el virus y el vector han coexistido en América por décadas sin infectar plantas cultivadas. En este sentido, se ha observado que la presencia de la banda que correspondió al *ToSRV* ha sido observada en todas las poblaciones analizadas en el presente trabajo, descartando una posible contaminación, lo que plantea interrogantes acerca del tiempo desde el que el *ToSRV* ha coexistido en el genoma de *C. brasiliense*. De todas maneras, este hallazgo reviste carácter de preliminar y habrá de confirmarse a través de la secuenciación y análisis de la banda de *ToSRV* en un mayor número de individuos de todas las poblaciones analizadas. No obstante no sería absurdo suponer que las infecciones con virus podrían ser frecuentes en la especie, explicando tal vez la presencia de componentes con actividad antiviral que se han descrito para *C. brasiliense* (Huerta Reyes, 2004; Kimura *et al.*, 2005).

La cuarta región que mostró diferencias entre las poblaciones analizadas en este trabajo fue el intrón del gen *trnL*. Cabe aclarar aquí que el gen *trnL* que contiene a este intrón, no es el mismo que flanquea la región *rpl32-trnL* anteriormente citada. Ambos genes codifican para distintos tRNA-Leu. El intrón del gen *trnL* es uno de los más utilizados en sistemática y filogeografía de plantas (Hollingsworth *et al.*, 2011). Taberlet *et al.* (2007) lo

han sugerido como una región apropiada para resolver conflictos a nivel de especies (*barcoding*). Por el contrario, Shaw *et al.* (2005) calificaron a este intrón como poco resolutivo, en parte, debido a que posee una estructura secundaria altamente conservada (P6-loop). No obstante, Hale *et al.* (2004) encontraron variantes intraespecíficas en un estudio filogenético realizada en el género *Clusia*. Los investigadores identificaron cuatro cpSSR en el intrón, tres mononucleotídicos (A)_n y uno dinucleotídico (TA)_n. A diferencia de lo informado para este género, en las poblaciones aquí analizadas de *C. brasiliense* esta región presentó una sola repetición mononucleotídica monomórfica, encontrándose además los otros tres cpSSRs interrumpidos (ver Tabla XXIX).

De lo anteriormente expuesto surge que para el caso de las poblaciones de *C. brasiliense* analizadas en el presente trabajo, el intrón del gen *trnL* se convirtió en la región cloroplástica más informativa y por tanto en la de elección para el análisis por cuanto presentó además cuatro transversiones y un InDel de 7 nucleótidos de longitud en el alineamiento de las secuencias de 43 individuos pertenecientes a todas las poblaciones estudiadas. Como se aclaró en la descripción de los resultados, es importante notar que de las cuatro sustituciones mencionadas, dos posiciones adyacentes corresponderían probablemente a una inversión, especialmente por constituir posiciones compartidas entre las muestras de México y Paraguay. Sin embargo, tan solo un individuo de la Isla Yacyretá presentó esta variante, por cuanto sería prudente ampliar el número de individuos analizados para especular acerca de la significancia filogeográfica de este cambio, pues podría tratarse de una mutación que surgió independientemente en estas poblaciones. Una situación similar fue observada por Huang *et al.* (2004), quienes encontraron una inversión de 11 pb en 3 individuos de dos poblaciones de *Trochodendron aralioides* (Trochodendraceae), habiendo muestreado 4 de cada una. En su trabajo discuten si el flujo génico es la explicación más probable de que esta estructura esté

presente en las dos poblaciones, o es un caso de cambio evolutivo paralelo u homoplasia, situación frecuente en muchas especies, concluyendo que parecería ser la segunda opción la más probable, ya que la composición haplotípica de las poblaciones es bastante diferente, y la inversión se presenta en dos haplotipos distintos. De igual manera que en las poblaciones de *C. brasiliense*, preveen la necesidad de re-evaluarlo analizando un mayor número de individuos.

En relación a los escasos sitios informativos identificados en *C. brasiliense*, que llevan a plantear la utilidad de la técnica seleccionada para la búsqueda de polimorfismos intraespecíficos, es importante resaltar y analizar la similitud entre individuos y poblaciones. Petit & Vendramin (2007) señalan que existen dos enfoques en el estudio de filogeografía de plantas. El primero toma en cuenta la frecuencia de las variantes haplotípicas entre y dentro de las poblaciones sin evaluar la similitud de los haplotipos, mientras que el segundo se limita a la construcción de filogenias intraespecíficas sin mensurar la variabilidad intrapoblacional. Para estos autores representa un gran desafío integrar ambas tendencias investigativas.

La obtención y descripción en el presente trabajo de siete nuevas regiones intergénicas y una intrónica cloroplásticas constituyen un aporte pionero para el conocimiento del ADNcp de *C. brasiliense*. De esta manera, fue posible cubrir 7.149 pb, equivalentes al 4,5% del genoma plastidial promedio de las angiospermas (135 – 160 kb, Downie & Palmer, 1992). Asimismo, además del aporte que significa para la especie, las secuencias están o estarán en breve disponibles en GenBank para el estudio de otras poblaciones de *C. brasiliense* a lo largo de toda su distribución (Percuoco *et al.*, en preparación).

V.3 Consideraciones sobre el origen de las poblaciones australes de *C. brasiliense*

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron discriminar las poblaciones de *C.brasiliense* argentinas respecto de las paraguayas. En éstas últimas se identificaron dos haplotipos, mientras que el tercer haplotipo corresponde a la población de México. En relación a la hipótesis planteada, estos resultados apoyan el origen común de las poblaciones argentinas, ya que al presentar un único haplotipo para todas las regiones analizadas probablemente otrora conformaron un continuo vegetacional. El hecho de presentar una única variante para cada región analizada, es decir, en conjunto, una única variante haplotípica que está completamente fijada remite a la fuerte estructuración que presenta el ADNcp en comparación con otros marcadores, y esta característica debe ser especialmente valorada en filogeografía (Petit & Vendramin, 2007). La diversidad nucleotídica total observada en este trabajo fue de 0,00237. Schaal *et al.* (1991) promediaron la diversidad encontrada en 46 estudios con ADNcp infraespecíficos de diferentes poblaciones, informando un valor de 0,0007, si bien este valor ha aumentado desde que se ha extendido el acceso a la secuenciación, encontrándose valores entre 0,00065 – 0,1500 en un breve registro de los valores de diversidad nucleotídica observada en estudios filogeográficos que Lu *et al.*, (2006) incluyeron en su trabajo. Una característica común a la mayoría de los trabajos de filogeografía de plantas disponibles es el alto número de poblaciones analizadas, con bajo número de individuos por población, lo que pone en evidencia la tendencia a enfatizar las diferencias interpoblacionales subestimando la variación intrapoblacional (Huang *et al.*, 2004; Petit & Vendramin, 2007). Pons & Petit (1995) demostraron que es necesario muestrear un número importante de poblaciones, más que muchos individuos por población, para obtener estimaciones de diferenciación más ajustadas. Para cálculos de máxima verosimilitud son suficientes 8 individuos o incluso un número menor, aunque considerando alineamientos de

2000 pb. El análisis de un mayor número de individuos incrementa la varianza de los parámetros calculados, y resta exactitud a los estimadores de θ (Pluzhnikov & Donelli, 1996; Felsestein, 2006). En nuestro trabajo se evaluaron 450 pb en seis poblaciones de *C. brasiliense*, lo cual, desde la óptica del análisis filogeográfico representa una evaluación limitada. Será conveniente y necesario incorporar un número mayor de poblaciones ubicadas todo a lo largo de la distribución de *C. brasiliense*, de manera de cubrir todo el rango de ocurrencia de la especie. Asimismo, se deberá aumentar la longitud del alineamiento que sustenta el análisis. En lo que respecta al primer punto se están realizando los intentos de colaboración con otros países a efectos de poder tener los permisos correspondientes que nos permitan acceder a muestras biológicas de otras poblaciones de *C. brasiliense* inclusive algunas que ni siquiera fueron exploradas aún, tal es el caso de poblaciones del norte de Paraguay, Perú y Bolivia. Respecto al segundo punto y teniendo en cuenta la evaluación realizada respecto de la informatividad de las regiones genómicas analizadas en *C. brasiliense* en el presente trabajo, será factible aumentar la longitud de las regiones analizadas.

Por otro lado, en las muestras de Paraguay se han identificado dos haplotipos, uno de estos compartiendo una inversión con las muestras que provienen de México. Como ya se discutió antes en esta sección, bien podría tratarse de un caso de homoplasia. Sin embargo, suponiendo que comparten un origen evolutivo común, surge el interrogante obligado sobre cuál es la ruta más probable por la que estas poblaciones han llegado hasta el sur de Paraguay y noreste de Argentina. En este sentido, el camino más plausible es suponer que son remanentes de la Provincia del Bosque Paranaense, la que comprende el noreste de Argentina y este de Paraguay. Sin embargo, se han encontrado tres registros de la especie en las selvas asociadas a cursos de agua del río Paraguay en el país homónimo, mientras que no se tiene información de que existan poblaciones más hacia el este, es decir, en los cursos de agua

tributarios del río Paraná. En Misiones (ARG) tampoco se ha hallado la especie, al menos hasta el momento, más al norte de San Ignacio, en selvas ribereñas del río Paraná. El hecho de que no se observen poblaciones en la zona del Alto Paraná puede deberse al lecho basáltico, éste produce el encajonamiento del río, que corre rápido y tumultuoso para lentificarse al llegar a las planicies del suroeste, donde cambiando de rumbo, las aguas se laminan y se mansan, permitiendo el depósito de las semillas livianas llegadas por flotación (Sanjurjo, 1994). De cualquier manera, esta discontinuidad geográfica contribuye a considerar una vía alternativa de colonización para las poblaciones de *C. brasiliense* analizadas. Esta vía podría ser el río Paraguay, que confluye con el río Paraná, y al cual desembocaba mucho más al sur en el pasado, confluencia que fue migrando a su ubicación actual acompañando el corrimiento hacia el norte del río Paraná. El río Paraguay y las selvas ribereñas, ¿pueden haber sido una vía de contacto entre las Subregiones Paranaense y Amazónica en el sur? Un argumento a favor del modelo propuesto, lo constituyen los resultados del análisis filogeográfico efectuado en muestras de 24 poblaciones de *C. brasiliense*, todas brasileñas, excepto una de procedencia costarricense (Néri, 2011; Salgueiro, 2011). Este trabajo encontró un haplotipo ampliamente distribuido en 14 poblaciones de la subregión Paranaense, mientras que 9 haplotipos se encontraron en las demás poblaciones, dos de la subregión Amazónica y 7 de la subregión Chaqueña que presentaron haplotipos restrictos a cada población. Estos autores propusieron una expansión reciente de la especie en la subregión Paranaense y sostienen que las selvas ribereñas actúan como puentes entre las subregiones Paranaense y Amazónica, atravesando la subregión Chaqueña, a través de las provincias Caatinga y Cerrado. Es decir, que *C. brasiliense* se encuentra en toda la Región Neotropical. En este sentido, cuando se buscan coincidencias con algún trazo individual que se parezca o que pudiera superponerse con el de *C. brasiliense* actualizado con los nuevos registros de Paraguay y Argentina, la mayor

similitud se observa con los que caracterizan la región Neotropical, particularmente el del hemíptero *Rhinacloa* (Figura 35; Morrone, 2001). El análisis de muestras del norte de Paraguay, de Bolivia, Perú y estados del oeste brasileño, así como de poblaciones de la zona centro y norte de la subregión Paranaense serían fundamentales para dilucidar los procesos que originaron los patrones de distribución observados y para poner a prueba el modelo que se propone en el presente trabajo.

Por otro lado, la segunda parte de la hipótesis planteada en el presente estudio, enuncia que el proceso de fragmentación que atravesaron estas poblaciones de distribución extrema sur de la especie, ocasionó la diferenciación genética de las poblaciones. Este hecho no se evidencia a partir del análisis del genoma cloroplástico y en este sentido deberíamos rechazar la hipótesis, ya que entre las poblaciones argentinas y paraguayas no existen valores de F_{ST} significativos. Sin embargo, no es posible hacerlo debido a que el tiempo transcurrido desde que el flujo génico entre las poblaciones comenzó a disminuir puede ser insuficiente para que surjan y/o se fijen variantes haplotípicas en estos remanentes, al menos en el genoma cloroplástico. No obstante, los resultados emergentes del análisis del genoma nuclear a través de los 56 *loci* RAPDs obtenidos, han puesto en evidencia un elevado grado de estructuración de las poblaciones de San Ignacio y Rincón Ombú, en concordancia con la diferenciación genética de las poblaciones enunciada en la hipótesis. Lamentablemente no fue posible incluir las otras tres poblaciones en el análisis por cuanto fueron recientemente identificadas e incorporadas al estudio, aunque sería interesante analizarlas en conjunto y con un número mayor de individuos. Datos similares fueron obtenidos en nueve poblaciones naturales de *Heptacodium miconioides* (Caprifoliaceae), donde se encontraron índices de diferenciación significativos entre todas las poblaciones mediante análisis con marcadores de tipo RAPDs. Sin embargo, las secuencias nucleotídicas de dos regiones intergénicas cloroplásticas *trnS*-



Figura 35. Trazo individual del hemíptero *Rhinacloa* que caracteriza a las especies de la Región Neotropical, y con el cual sería comparable el trazo de de *C. brasiliense* actualizado con las poblaciones argentinas y paraguayas. Tomado de Morrone (2001, pag. 26).

trnG y *petG-trnP*, ambas empleadas también en el presente trabajo, compartieron una identidad del 100% en todos los individuos analizados (Lu *et al.*, 2006).

Se espera integrar estos resultados con las interpretaciones geológicas, edafológicas, climáticas y estudios de la comunidad ribereña que se han hecho en proyectos paralelos encarados por nuestro grupo, para elaborar un modelo robusto que intente explicar la distribución austral actual de *C. brasiliense*.

V.4 Implicancias de los resultados obtenidos para la conservación de las poblaciones de *C. brasiliense*

En los últimos años mucho se ha escrito y proyectado con el objeto de preservar las comunidades ribereñas, conocidas también como matas ciliares. El término “ciliar” hace referencia a “cilios” y se relaciona con la función de protección que poseen estas formaciones vegetales ante distintos factores ambientales. Entre los servicios ecológicos que brindan previenen la erosión del suelo a través de la red de raíces que conforman, regulan la calidad del agua actuando como filtro de distintos sedimentos químicos, así como la cantidad del agua, ya que aseguran una absorción adecuada y el reabastecimiento de las nacientes de ríos y arroyos. La sombra y la humedad de estos ambientes se convierten en *buffers* térmicos de los cuerpos de agua, favoreciendo la supervivencia de especies acuáticas, además de constituir el hábitat de numerosas especies de la fauna local que albergan en su interior. Además de estos servicios ecosistémicos, poseen un alto valor paisajístico y son fuente de resinas y compuestos medicinales de importancia para el hombre (Tatto & Gazetta, 2009). En este sentido, a continuación se analizan, en el marco de la genética de la conservación, las contribuciones concretas que los resultados obtenidos en el presente trabajo significan para orientar las

acciones de conservación que se están desarrollando, así como para plantear nuevas estrategias de manejo.

El concepto de *Evolutionary Significant Unit* (ESU) como unidad para priorizar la conservación de las poblaciones fue introducido por Moritz (1994a). Una ESU está conformada por poblaciones que presenten monofilia recíproca y que estén genéticamente diferenciadas a nivel de ADN mitocondrial o ADNmt y *loci* nucleares. El método para tomar decisiones sobre qué conservar generó un gran debate y fueron propuestos diversos enfoques, algunos incluso contrapuestos al concepto de ESU de Moritz (1994a). Entre las críticas que recibió la propuesta, la referencia a la diferenciación de linajes de ADNmt limita o impide su aplicación en estudios filogeográficos de plantas, dado que como se aclarara en la introducción, el ADNmt de plantas evoluciona hasta 100 veces más lento que el de animales (Coates, 2000; Fraser & Bernatchez, 2001). Para el caso, son ejemplo las poblaciones de *C. brasiliense* aquí analizadas, en las que se obtuvo gran diferenciación a nivel nuclear, mientras que la distancia genética fue nula a nivel de ADNcp. A causa de ésta y otras restricciones que surgieron en el uso práctico del concepto de ESU, Moritz (1994b) planteó la categoría de *Management Unit* (MU), más flexible y por dentro de las ESUs, dado que engloba a las poblaciones genéticamente diferenciadas, ya sea a nivel de genoma nuclear o mitocondrial, y se entiende en tiempos ecológicos más que geológicos, siendo útil para orientar el monitoreo contemporáneo de las poblaciones, sin tener en cuenta los factores históricos que las estructuraron (Fraser & Bernatchez, 2001). En esta categoría pueden incluirse a las poblaciones de *C. brasiliense* de San Ignacio y Rincón Ombú, altamente diferenciadas. Puede alegarse además que en el análisis realizado no se han estimado los tamaños efectivos de las poblaciones y el número de migrantes, y los índices de diferenciación dependen de estos parámetros. Allendorf *et al.* (2013), por su parte, previenen

acerca de que poblaciones de tamaño grande pueden presentar bajo número de migrantes por más que posean índices bajos de diferenciación, especialmente considerando que el tamaño efectivo suele ser menor que el tamaño poblacional total. Sin embargo, para la situación de las poblaciones argentinas analizadas tal recomendación es irrelevante dado que el índice ϕ_{ST} estimado es alto. De modo que en términos de conservación, se recomienda que sean preservadas y manejadas ambas poblaciones en forma independiente. Apoyando esta sugerencia, además de encontrarse diferencias en las frecuencias génicas, se han identificado alelos exclusivos en ambas poblaciones, 5 en SI y 9 en RO, que representan el 10 y el 17 % respectivamente.

Las acciones tendientes a la conservación de especies pueden clasificarse en *in situ* y *ex situ*. En el caso de la conservación *in situ* las poblaciones de *C. brasiliense* deberán preservarse en forma independiente como se explicó anteriormente. En cuanto a la definición del área que será conservada, se cuenta con la información que proviene del análisis de estructuración genética espacial que requiere un mínimo de 20 m y una distancia óptima de 80 m o más para asegurar la perpetuación de la variabilidad genética en el tiempo, al menos en San Ignacio. Se ha discutido la importancia de la presencia de polinizadores y agentes dispersores por lo cual también se deberá preservar el área de cualquier actividad que impacte sobre la flora y fauna.

Las estrategias de conservación *ex situ* comprenden la creación de bancos de germoplasma y producción de plántulas bajo condiciones controladas. Fernandes de Souza *et al.* (2012) evaluaron la estructuración genética de poblaciones de “cañafistula” (*Peltophorum dubium*) y “capixingui” (*Croton floribundus*) en fragmentos selváticos del Estado de Paraná (Brasil) para llevar adelante un proyecto de restauración, encontrando resultados

significativos. No obstante, los valores estuvieron por debajo de 0,05, indicando baja diferenciación genética entre las poblaciones, por lo que recomendaron colectar semillas en unos pocos fragmentos a fin de optimizar recursos y dedicar mayor esfuerzo a la acción de restauración. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo requieren el manejo individual de las poblaciones, mientras que la colección de semillas en SI debe efectuarse teniendo en cuenta las distancias críticas encontradas en el análisis de autocorrelación espacial.

Será necesario integrar los datos genéticos nucleares y cloroplásticos con información demográfica, edafológica y estudios de la comunidad asociada para establecer estrategias efectivas de manejo de las poblaciones de “arary” en Argentina y Paraguay. Sobran ejemplos de estudios de poblaciones de plantas, a veces realizados con el objetivo de demostrar la disminución y la pérdida de variabilidad genética en poblaciones fragmentadas, otras informando que los monitoreos demográficos a lo largo del tiempo indican que el éxito reproductivo se ve afectado por los procesos de fragmentación. Sin embargo, falta integrar estos aspectos para tener un panorama completo de la situación de las poblaciones frente a la destrucción y fragmentación del hábitat, y en qué grado se ven afectadas por estos impactos (Oostermeijer *et al.*, 2003). Esto también implica el estudio de comunidades y las relaciones que hacen a la dinámica ecosistémica, sin restringirse al nivel de especie, descuidando así niveles superiores de diversidad (Falk *et al.*, 1990). Más importante aún es reconocer que el compromiso va más allá de lo científico, que es fundamental comprender que las decisiones inherentes a la conservación involucran factores sociales, económicos y culturales, donde, tal como lo afirman De Salle & Amato (2004) el verdadero desafío para la genética de la conservación es aportar claridad y científicidad acerca del impacto de las decisiones relacionadas con la conservación de los ambientes naturales en esa compleja trama social.



VI. Conclusiones

VI. Conclusiones

- Se realizó la caracterización genética rápida de un total de 61 individuos de *C. brasiliense* procedentes de las poblaciones de San Ignacio y Rincón Ombú a partir de 56 marcadores RAPDs, obteniéndose valores moderados de diversidad genética (0,250 para San Ignacio y 0,296 para Rincón Ombú) y observándose además que el 78% de la variabilidad se encuentra mayormente distribuida dentro de las poblaciones. La distancia genética interpoblacional fue elevada (0,185) y el índice de diferenciación estimado indicó un alto grado de divergencia genética (0,283).
- La población de *C. brasiliense* emplazada en la localidad de San Ignacio presentó estructuración espacial débil a escala local hasta una distancia de 20 m. Asimismo quedó demostrado que, los individuos que distan más de 80 m están menos relacionados genéticamente que lo que estarían en función del valor probabilístico esperado. La distancia mínima deberá ser tomada en cuenta para definición de áreas de manejo y colección de semillas.
- Se describieron por primera vez ocho regiones cloroplásticas en *C. brasiliense*, 7 correspondieron a regiones intergénicas y una única región intrónica, sumando un total de 7.149 pb a los 2.380 pb previamente disponibles en GenBank. A partir de estas regiones se demostró la existencia de un único haplotipo cloroplástico para las poblaciones argentinas de *C. brasiliense*, sosteniendo la hipótesis postulada de la existencia de un continuo vegetacional en el pasado.
- El análisis de las secuencias intergénicas reveló diferencias nucleotídicas en tres de éstas, pudiéndose determinar dos haplotipos en los tres casos, uno exclusivo de las

muestras derivadas de una población de México, mientras que el segundo correspondió a las poblaciones de Argentina y Paraguay.

- El análisis filogeográfico fue efectuado en base al alineamiento de 43 secuencias de la región intrónica del gen *trnL* secuenciada con un par de *primers* específicos desarrollados para *C. brasiliense*. Se consiguieron identificar tres haplotipos: el H1, más frecuente, presente en las poblaciones de Argentina y Paraguay; el H2 exclusivo de la Isla Yacyretá (PY) y el H3 como única variante encontrada en las muestras de México. La diversidad nucleotídica (0,00237) y la diversidad haplotípica (0,286) fueron bajas en su conjunto, no hallándose índices de diferenciación significativos entre las poblaciones de ARG y PY. La red de haplotipos y el árbol filogenético contruidos mostraron que existe mayor relación entre el H2 y H3, planteándose un modelo plausible referido a posibles vías de transporte y colonización de *C. brasiliense* en el pasado, las que representarían vías alternativas a la ofrecida por el río Paraná.



VII. Bibliografía

VII. Bibliografía

- Aagaard** JE, KV Krutovskii, SH Strauss (1998) RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. *Heredity* 81 (1) 69-78.
- Abdelkrim** J, BC Robertson, JL Stanton, NJ Gemmel (2009) Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques* 46 (3) 185-192.
- Adams** JM, H Faure, L Faure-Denard, JM McGlade, FI Woodward (1990) Increases in terrestrial carbon storage from the Last Glacial Maximum to the present. *Nature* 345, 711-714.
- Aldrich** PR, JL Hamrick, P Chavarriaga, G Kochert (1998) Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology* 7(8) 933-944.
- Allendorf** FW, L Gordon, SN Aitken (2013) Conservation and the genetics of populations. Wiley-Blackwell, UK.
- Allentoft** ME, SC Schuster, RN Holdaway, ML Hale, E McLay, C Oskam, MTP Gilbert, P Spencer, E Willerslev, M Bunce (2009) Identification of microsatellites from an extinct moa species using high-throughput (454) sequence data. *BioTechniques* 46 (3) 195-200.
- Argout** X, J Salse, JM Aury, MJ Guiltinan, G Droc, J Gouzy [et al] (2010) The genome of *Theobroma cacao*. *Nature genetics* 43(2) 101-108.
- Arias** DM, AL Albarrán-Lara, A González-Rodríguez, J Peñaloza-Ramírez, O Dorado, E Leyva (2012) Genetic diversity and structure of wild populations of the tropical dry forest tree *Jacaratia mexicana* (Brassicales: Caricaceae) at a local scale in Mexico. *Revista de Biología Tropical* 60(1) 01-10.
- Arif** IA, MA Bakir, HA Khan, AH Al Farhan, AA Al Homaidan, AH Bahkali, M Al Sadoon, M Shobrak (2010) A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *International journal of molecular sciences* 11(5) 2079-2096.
- Avila-Pires** TCS (1995) Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata). *Zoologische Verhandelingen* 299(1)1-706.
- Avise** JC, J Arnold, RM Ball, E Bermingham, T Lamb, JE Niegel, CA Reeb y NC Saunders (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 489-522.
- Avise** JC (2000) Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press.
- Avise** JC (2004) Molecular Markers, Natural History, and Evolution. 2da Ed. Sinaur Associates, Inc. Publisher Sunderland, MA, USA.
- Bai** W, W Liao, D Zhang (2010) Nuclear and chloroplast DNA phylogeography reveal two refuge areas with asymmetrical gene flow in a temperate walnut tree from East Asia. *New Phytologist* 188, 892-901.
- Bandelt** HJ, P Forster, A Röhl (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16, 37-48.
- Barbosa** JC, SS Barreto, AK Inoue-Nagata, MS Reis, AC Firmino, A Bergamin Filho, JAM Rezende (2009) Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. *Journal of General Plant Pathology* 75(6) 440-443.
- Battistuzzi** FU, AJ Filipinski, S Kumar (2011) Molecular clock: testing. En: *eLS*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd [doi: 10.1002/9780470015902.a0001803.pub2]. 7p

- Bezerra-Agasie** IC, GB Ferreira, AC de Avila, AK Inoue-Nagata (2006) First report of *Tomato severe rugose virus* in chili pepper in Brazil. *Plant Disease* 90(1) 114-114.
- Biganzoli** F, M Múlgura (2004) Inventario florístico del Parque Provincial Teyú Cuaré y alrededores (Misiones, Argentina). *Darwiniana* 42, 1-24.
- Botrel** M, A De Souza, D de Carvalho, S do Carmo, M De Oliveira, R Estopa (2006) Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. em duas populações de mata ciliar. *Revista Árvore* 5, 821-827.
- Brieger** FG (1969) Patterns of evolutionary and geographical distribution in neotropical orchids. *Biological Journal of the Linnean Society* 1 (1-2) 197-217.
- Brinkmann** B, M Klintschar, F Neuhuber (1998) Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet* 62, 1408-1415.
- Brooks** TM, RA Mittermeier, CG Mittermeier, GAB da Fonseca, AB Rylands, WR Konstant, P Flick, J Pilgrim, S Oldfield, G Magin, C Hilton-Taylor (2002) Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation Biology* 16(4) 909– 923.
- Brown** AHD, BS Weir (1983) Measuring genetic variability in plant populations, in *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A*. Tanksley SD, TJ Orton, Editors. Elsevier Science Publ.: Amsterdam. p. 219-239.
- Buffon Isaías** DE (2004) Determinação de princípios ativos das diferentes partes de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) Camb. Tesis de maestría. Universidad do Vale do Itajaí (UNIVALI), Brasil.
- Bussell** JD (1999) The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology* 8(5) 775-789.
- Cabrera** AL (1976) Regiones Fitogeográficas Argentinas. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo II. ACME, Buenos Aires.
- Carbone** I, LM Kohn (2001) A microbial population-species interface: nested cladistics and coalescent inference with multilocus data. *Molecular Ecology* 10, 947-964.
- Carnavale-Bottino** M (2006) Análise da diversidade genética de populações de *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) utilizando marcadores AFLP. Tesis de Doctorado en Genética. Instituto de Biología. Universidad Federal de Rio de Janeiro.
- Carver** T, N Thomson, A Bleasby, M Berriman, J Parkhill (2009) DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinfo* 25 (1) 119-120.
- Casas** AM, E Igartua, G Balaguer, MA Moreno (1999) Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analyzed by RAPD markers. *Euphytica* 110(2) 139-149.
- Castoe** TA, AW Poole, W Gu, AP Jason de Koning, JM Daza, EN Smith, DD Pollock (2010) Rapid identification of thousands of copperhead snake (*Agkistrodon contortrix*) microsatellite loci from modest amounts of 454 shotgun genome sequence. *Mol Ecol Res* 10, 341–347.
- Chase** MW, HH Hills (1991) Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40, 215-220.
- Chhipi Shrestha** JK, T Bhattarai, J Sijapati, N Rana, J Maharjan, DS Rawal, BB Raskoti, S Shrestha (2013) Assessment of Genetic Diversity in Nepalese Populations of *Swertia chirayita* (Roxb. Ex Fleming) H. Karst Using RAPD-PCR Technique. *AJPS* 4, 1617-1628.

- Coates DJ** (2000) Defining conservation units in a rich and fragmented flora: implications for the management of genetic resources and evolutionary processes in south-west Australian plants. *Australian Journal of Botany* 48, 329 - 339.
- Colinvaux PA, MB Bush, M Steinitz-Kannan, MC Miller** (1997) Glacial and postglacial pollen records from the Ecuadorian Andes and Amazon. *Quaternary Research* 48(1) 69-78.
- Colinvaux PA, PE De Oliveira, MB Bush** (2000) Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scales: The failure of the aridity and refuge hypotheses. *Quaternary Science Reviews* 19, 141-169.
- Costa LP** (2003) The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography* 30(1) 71-86.
- Crisci JV, L Katinas, P Posadas** (2000) Introducción a la teoría y práctica de la biogeografía histórica. Sociedad Argentina de Botánica. Bs. As.
- Crisci JV** (2001) The voice of historical biogeography. *Journal of Biogeography* 28, 157-168.
- Crisci JV, L Katinas, P Posadas** (2003) Historical biogeography: an introduction. Harvard University Press: Boston.
- Da Silva A** (2007) Comparação florística de florestas inundáveis das regiões Sudeste e Sul do Brasil. *Revista Brasil. Bot.* 30(2) 257-269.
- Dangi R, M Lagu, L Choudhary, P Ranjekar, V Gupta** (2004) Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. *BMC plant biology*, 4(1) 13.
- Dauber EM, Block, WR Schwartz** (2000) Mutational events at human micro- and minisatellite loci: mutation rates and new STR-alleles. Sensabaugh GF, PJ Lincoln, B Olaisen (Eds). *Progress in Forensic Genetics, Elsevier, Amsterdam* 8:21-23.
- De Salle R, G Amato** (2004) The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics* 5(9) 702-712.
- De Souza A** (2006) Estrutura genética de populações naturais de *Calophyllum brasiliense* Camb. na bacia de Alto Rio Grande. Tesis de doctorado. Universidad Federal de Lavras. Minas Gerais, Brasil.
- De Souza AM, D De Carvalho, F De Almeida Vieira, LH Do Nascimento, DC De Lima** (2007) Estrutura genética e espacial de populações naturais de *Calophyllum brasiliense* Camb. em Mata de Galeria. *Cerne, Lavras* 13, 239-247.
- Degen B, H Caron, E Bandou, L Maggia, MH Chevallier, A Leveau, A Kremer** (2001) Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analyzed by RAPDs. *Heredity* 87, 497-507.
- Degen B, E Bandou, H Caron** (2004) Limited pollen dispersal and biparental inbreeding in *Symphonia globulifera* in French Guiana. *Heredity* 93(6) 585-591.
- Demesure B, N Sodzi, RJ Petit** (1995) A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol.* 4, 129-131.
- Demesure B, B Comps, RJ Petit** (1996) Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution* 50, 2515-2520.
- Dharmaratne HRW, GT Tan, GP Marasinghe, JM Pezzuto** (2002) Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication by *Calophyllum* coumarins and xanthenes. *Planta Med.* 68, 86-87.

- Dias LAS, PY Kageyama** (1991) Variação genética em espécies arbóreas e consequências para o melhoramento florestal. *Agrotrópica* Ilhéus, 3 (3) 119-27.
- Dick CW, OJ Hardy, FA Jones, RJ Petit** (2008) Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. *Tropical Plant Biology* 1(1) 20-33.
- Doligez A, HI Joly** (1997) Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical forest tree species, *Carapa procera* (Meliaceae) in French Guiana. *Heredity* 79, 72-82.
- Domingues Torezan JMD, RFD Souza, PM Ruas, CDF Ruas, EH Camargo, ALL Vanzela** (2005) Genetic variability of pre and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48(2) 171-180.
- Double MC, R Peakall, NR Beck, A Cockburn** (2005) Dispersal, philopatry and infidelity: dissecting local genetic structure in superb fairy-wrens (*Malurus cyaneus*). *Evolution* 59, 625-635.
- Downie SR, JD Palmer** (1992) Restriction site mapping of the chloroplast DNA inverted repeat: a molecular phylogeny of the Asteridae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79, 266-283.
- Doyle JJ, LJ Doyle** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15.
- Dumolin-Lapegue S, MH Pemonge, RJ Petit** (1997) An enlarged set of consensus *primers* for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology* 6, 393-397.
- Dutech C, L Maggia, HI Joly** (2000) Chloroplast diversity in *Vouacapoua americana* (Caesalpinaceae), a Neotropical forest tree. *Mol. Ecol.* 9, 1427-1432.
- El Mousadik A, RJ Petit** (1996) Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco. *Mol. Ecol.* 5, 547-555.
- Escudero A, JM Iriondo, ME Torres** (2003) Spatial analysis diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation* 113, 351-365.
- Estopa RA, AM De Souza, MC de Oliveira Moura, MC Gaspar Botrel, E Galvão Mendonça, D de Carvalho** (2006) Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). *Scientia Forestalis* 70, 97-106.
- Falk DA** (1990) Integrated strategies for conserving plant genetic diversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 38-47.
- Felsenstein J** (2006) Accuracy of coalescent likelihood estimates: do we need more sites, more sequences, or more loci? *Molecular biology and evolution* 23(3) 691-700.
- Fernandes de Souza R, B Duarte Ziroldo, EF Rossetto, AL Cavalheiro, JM DominguesTorezan, AL LaforgaVanzela** (2012) The use of genetic structure as a guide for seed gathering for forest restoration. *R. Bras. Bioci.* 10(3) 309-313.
- Fernández Rausch F, L Cunha de Albuquerque, L de Britto Giordano, L Silva Boiteux, AC de Ávila, AK Inoue-Nagata** (2008) Diversity prevalence of Brazilian bipartite Begomoviruses species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36, 251-258.
- Ferreira ME, D Grattapaglia** (1996) Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 2º ed. EMBRAPA.
- Fineschi S, D Turchini, F Villani, GG Vendramin** (2000) Chloroplast DNA polymorphism reveals little geographical structure in *Castanea sativa* Mill. (Fagaceae) throughout southern European countries. *Mol. Ecol.* 9, 1495-1503.
- Fischer E, FAM Dos Santos** (2001) Demography, phenology and sex of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) trees in the Atlantic forest. *Journal of Trop. Ecol.* 17, 903-909.

- Forrest AD**, ML Hollingsworth, PM Hollingsworth, C Sydes, RM Bateman (2004) Population genetic structure in European populations of *Spiranthes romanzoffiana* set in the context of other genetic studies on orchids. *Heredity* 92(3) 218-227.
- Frankham R**, JD Ballou, DA Briscoe (2002) “*Introduction to Conservation Genetics*”. 1ra. Ed. Cambridge University Press. USA.
- Fraser DJ**, L Bernatchez (2001) Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Mol. Ecol.* 10(12) 2741-2752.
- Freeland JR** (2005) *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Fu Y** (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915-925.
- Futuyma JD** (2005) “*Evolution*”. Sunderland, MA.
- Gaggiotti OE**, O Lange, K Rassmann (1999) A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Mol. Ecol.* 8, 1513-1520.
- Galindo-Leal C**, I De Gusmão Câmara (2005a) Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. Cap.I. En Galindo-Leal C, I de Gusmão Câmara (Eds) “*Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas*”. Belo Horizonte, Brasil.
- Galindo-Leal C**, TM Jacobsen, PF Langhammer, S Olivieri (2005b) Estado dos hotspots: a dinâmica da perda de biodiversidade. Cap.II. En Galindo-Leal C, I de Gusmão Câmara (Eds) “*Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas*”. Belo Horizonte, Brasil.
- Galindo-Leal C** (2005c) Reunindo as peças: a fragmentação e a conservação da paisagem. Cap.XXXI. En Galindo-Leal C, I de Gusmão Câmara (Eds) “*Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas*”. Belo Horizonte, Brasil.
- Galvão Mendonça E** (2006) Análise da diversidade genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. por marcadores RAPDs em populações de mata ciliar. Monografia apresentada para optar a título de Ingeniera Forestal. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brazil.
- Gasparotto JRA**, MA Benzan, IC Piloto, DAZ Cortez (2005) Estudo fitoquímico da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae). *Quim. Nova* 28, 575-578.
- Gielly L**, P Taberlet (1994) The Use of Chloroplast DNA to Resolve Plant Phylogenies: Noncoding versus rbcL Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 11(5) 769-777.
- Gillies ACM**, C Navarro, AJ Lowe, AC Newton, M Hernández, J Wilson, JP Cornelius (1999) Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*) assessed using RAPDs. *Heredity* 83, 722-732.
- Giraud AR**, H Povedano, MJ Belgrano, E Krauczuk, U Pardiñas, A Miquelarena, D Ligier, D Baldo, M Castelino (2005) Status da biodiversidade da Mata Atlântica de Interior da Argentina. En: Galindo-Leal C, I de Gusmão Câmara (Eds) “*Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas*” Belo Horizonte, Brasil. 15: 160-168.
- Godoy JA** (2009) La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies”. *Ecosistemas* 18, 23-33.
- Goldstein DB**, C Schlötterer (1999) “*Microsatellites: Evolution and Applications*”. Oxford University Press.
- Gonzalez EG** (2003) Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia* 59, 377-388.

- Grivet D, B Heinze, GG Vendramin, RJ Petit** (2001) Genome walking with consensus *primers*: application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes* 1, 345-349.
- Gutiérrez-Rodríguez C, JF Ornelas, F Rodríguez-Gómez** (2011) Chloroplast DNA phylogeography of a distylous shrub (*Palicourea padifolia* Rubiaceae) reveals past fragmentation and demographic expansion in Mexican cloud forests. *Molecular phylogenetics and evolution* 61(3) 603-615.
- Haffer J** (1969) Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165, 131-137.
- Hale ML, J Squirrel, AM Borland, K Wolff** (2002) Isolation of polymorphic microsatellite loci in the genus *Clusia* (Clusiaceae). *Molecular Ecology Notes* 2, 506-508.
- Hale ML, AM Borland, MH Gustafsson, K Wolff** (2004) Causes of Size Homoplasmy Among Chloroplast Microsatellites in Closely Related *Clusia* Species. *Journal of Molecular Evolution*, 58, 182-190.
- Hale ML, AM Borland, K Wolff** (2005) High degree of conservation of nuclear microsatellite loci in the genus *Clusia*. *Genome* 48, 946-950.
- Hall TA** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- Hamilton MB** (1999) Four *primer* pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Mol. Ecol.* 8, 513-525.
- Hamza NB** (2010) Cytoplasmic and nuclear DNA markers as powerful tools in populations studies and in setting conservation strategies. *African Journal of Biotechnology* 9, 4510-4515.
- Harding RM** (1996) New phylogenies: an introductory look at the coalescent. En: Harey PH, AJ Leigh Brown, J Maynard Smith, S Nee (eds.). "New uses for new phylogenies". Oxford University Press, Nueva York, EUA. pp 15-22.
- Hardy OJ, L Maggia, E Bandou, P Breyné, H Caron, MH Chevallier, A Doligez, C Dutech, A Kremer, C Latouche-Hallé, V Troispoux, V Veron, B Degen** (2006) Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Mol. Ecol.* 15(2) 559-571.
- Hare MP** (2001) Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution* 16, 700-706.
- Hartl DL, Clark AG** (2007) "Principles of population genetics". Sinauer.
- He F, D Kang, Y Ren, LJ Qu, Y Zhen, H Gu** (2007) Genetic diversity of the natural populations of *Arabidopsis thaliana* in China. *Heredity* 99(4) 423-431.
- Hedrick PW** (1999) Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53, 313-318.
- Henke W, K Herdel, K Jung, D Schnorr, SA Loening** (1997) Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic acids research* 25(19) 3957-3958.
- Herbst R** (1971) Esquema estratigráfico de la provincia de Corrientes, República Argentina. *Rev. Asoc. Geol. Arg.* 26 (2), 221-243.
- Herbst R** (2000) La Formación Ituzaingó (Plioceno). Estratigrafía y distribución. *El Neógeno Argentino. INSUGEO. Serie Correlación Geológica* 14, 181-190.
- Hilton-Taylor C** (2000) 2000 "IUCN red list of threatened species". Gland, Switzerland and Cambridge, UK: The World Conservation Union.

- Hu LJ**, K Uchiyama, HL Shen, Y Saito, Y Tsuda, Y Ide (2008) Nuclear DNA microsatellites reveal genetic variation but a lack of phylogeographical structure in an endangered species, *Fraxinus mandshurica*, across north-east China. *Annals of botany* 102(2) 195-205.
- Huang S**, S Hwang, J Wang, T Lin (2004) Phylogeography of *Trochodendron aralioides* (Trochodendraceae) in Taiwan and its adjacent areas. *Journal of Biogeography* 31, 1251–1259.
- Hueck K** (1978) “*Los Bosques de Sudamérica. Ecología, composición e importancia económica*”. Sociedad Alemana de Cooperación Técnica, Ltda. Eschborn, Alemania.
- Huerta-Reyes M**, MC Basualdo, L Lozada, M Jimenez-Estrada, C Soler, R Reyes-Chilpa (2004) HIV-1 Inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 916-920.
- Hutchings MJ** (1997) The structure of plant populations. En Crawly MJ (eds) “*Plant ecology*”. Blackwell Science, Oxford, 325-358.
- Hwang SY**, TP Lin, CS Ma, CL Lin, JD Chung, JC Yang (2003) Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch analysis of chloroplast DNA variation. *Mol. Ecol.* 12(10) 2689-2695.
- Inoue M**, KJ Kelley, A Frary, LE Craker (2013) A measure of genetic diversity of goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) by RAPD analysis. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 60, 1201–1207
- Isabel N**, J Beaulieu, J Bousquet (1995) Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(14) 6369-6373.
- Isabel N**, J Beaulieu, P Thériault, J Bousquet (1999) Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Molecular Ecology* 8(3) 477-483.
- Ishii T**, SR McCouch (2000) Microsatellites and microsynteny in the chloroplast genomes of *Oryza* and eight other Gramineae species. *Theoretical and Applied Genetics* 100(8) 1257-1266.
- Jiménez P**, C Collada (2000) Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.:* Fuera de Serie n.º 2-2000.
- Joshi SP**, PK Ranjanekar, VS Gupta (1999) Molecular markers in plant genome analysis. *Current Science* 77, 230–240.
- Kageyama PY**, FB Gandara, LMI Souza (1998) Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. *Série Técnica IPEF* 12 (32) 65-70.
- Karp A**, KJ Edwards (1995) Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies, en Ayad WG, T Hodgkin, A Jaradat, VR Rao (eds), “*Molecular genetic techniques for plant genetic resources*”. Report of an IPGRI workshop, 9-11 October 1995, Rome, Italy.
- Kawaguici CB**, PY Kageyama (2001) Diversidade genética de três grupos de indivíduos (adultos, jovens e plântulas) de *Calophyllum brasiliense* em uma população de mata de galeria. *Scientia Forestalis* 59, 131-143.
- Kelchner SA**, JF Wendel (1996) Hairpins create minute inversions in non-coding regions of chloroplast DNA. Springer. *Curr Genet* 30, 259-262.
- Kelchner SA** (2000) The Evolution of Non-Coding Chloroplast DNA and Its Application in Plant Systematics. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 87, 482-498.
- Kimura M**, JF Crow (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49, 725-73.

- Kimura M**, T Ohta (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75, 2868-2872.
- Kimura S**, C Ito, N Jyoko, H Segawa, J Kuroda, M Okada, S Adachi, T Nakahata, T Yuasa, V Cechinel Filho, H Furukawa, T Maekawa (2005) Inhibition of Leukemic Cell Growth by a Novel Anti- Cancer Drug (GUT – 70) from *Calophyllum brasiliense* that acts by induction of apoptosis. *Int. J. Cancer* 113, 158-165.
- Krauczuk ER**, M Rodríguez, AE Cardozo, HA Keller (2013) Nuevos registros de plantas micoheterótrofas aclorofiladas para la provincia de Corrientes, Argentina. *Bonplandia* 22, 29 – 33.
- Leitao-Filho HF** (1982) Aspectos taxonômicos das florestas do Estado de São Paulo. *Silvicultura em São Paulo* 16 A: 197-206. En Marques MCM, SM Silva, A Salino (2003) “Florística e estrutura do componente arbustivo arbóreo de uma floresta higrófila da bacia do rio Jacaré-Pepira, Sp, Brasil”. *Acta bot.bras.* 17(4) 495-506.
- Levinson G**, GA Gutman (1987) Slipped-Strand Mispairing: A Major Mechanism for DNA Sequence Evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4(3) 203-221.
- Lewontin RC** (1972) The apportionment of human diversity. En: Dobzhansky T, MK Hecht, WC Steere (eds.) “*Evolutionary Biology* 6”. New York: Appleton-Century-Crofts. 381–398.
- Lian C**, Z Zhou, T Hogetsu (2001) A simple method for developing microsatellite markers using amplified fragments of Inter-simple Sequence Repeat (ISSR). *J. Plant. Res.* 114, 381-385.
- Lihová J**, H Kudoh, K Marhold (2010) Genetic structure and phylogeography of a temperate-boreal herb, *Cardamine scutata* (Brassicaceae), in northeast Asia inferred from AFLPs and cpDNA haplotypes. *American Journal of Botany* 97(6) 1058-1070.
- Litt M**, JA Luty (1989) A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene. *American Journal of Human Genetics* 44, 397-401.
- Liu Y**, M Xing, W Zhao, R Jun Fan, S Luo, X Chen (2012) Genetic diversity analysis of *Rhododendron aureum* Georgi (Ericaceae) located on Changbai Mountain using ISSR and RAPD markers. *Plant Syst. Evol.* 298, 921–930
- Lobo PC**, CA Joly (2000) Aspectos ecofisiológicos da vegetação de mata ciliar do sudeste do Brasil. En Ribeiro Rodrigues R, HF Leitão Filho (eds.). “*Matas Ciliares: conservação e recuperação*”. Editorial Universidad de São Paulo 143-157.
- Lourenço WR** (1986) Diversité de la faune scorpionique de la region Amazonienne; centres d'endémisme; nouvel appui à la théorie des refuges forestiers du Pléistocène. *Amazoniana* 94(4) 559-580.
- Lunt DH**, WF Hutchinson, GR Carvalho (1999) An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Mol. Ecol.* 8, 891-894.
- Lynch M**, BG Milligan (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3, 91-99.
- Mantel N** (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27, 209-220.
- Mardulyn P**, N Othmezouri, YE Mikhailov, JM Pasteels (2011) Conflicting mitochondrial and nuclear phylogeographic signals and evolution of host-plant shifts in the boreo-montane leaf beetle *Chrysomela lapponica*. *Molecular phylogenetics and evolution* 61(3) 686-696.

- Marques MC, SM Silva, A Salino** (2003) Florística e estrutura do componente arbustivo-arbóreo de uma floresta higrófila da bacia do rio Jacaré-Pepira, SP, Brasil. *Acta botanica brasílica* 17(4) 495-506.
- Marques MCM, E Fischer** (2009) Effect of bats on seed distribution and germination of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae). *Ecotropica*, 15(1/2) 1-6.
- Martínez-Crovetto R** (1963) Esquema Fitogeográfico de la Provincia de Misiones. *Bonplandia* 1(3) 171-223.
- Mccauley DE** (1995) The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Tree* 10(5),198-202.
- Mereles MF** (2004) Humedales y bosques inundados. *Rojasiana* 1, 21-32.
- Metzger JP, LC Bernacci, R Goldenberg** (1997) Pattern of tree species diversity in riparian forest fragments of different widths (SE Brazil). *Plant Ecology* 133, 135-152.
- Ming R, S Hou, Y Feng, Q Yu, A Dionne-Laporte, JH Saw [et al]** (2008) The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* L.). *Nature* 452 (7190) 991-996.
- Mitton JB** (1994) Molecular approaches to populations biology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25, 45-69.
- Mohanty A, JP Martín, I Aguinagalde** (2001) A population genetic analysis of chloroplast DNA in wild populations of *Prunus avium* L. in Europe. *Heredity* 87, 421–427.
- Morales FJ, PK Anderson** (2001) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of virology* 146(3) 415-441.
- Moritz C** (1994a) Defining ‘evolutionary significant units’ for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9, 373–375.
- Moritz C** (1994b) Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: critical review. *Mol. Ecol.* 3, 401–411.
- Morrone JJ, M del C Coscarón** (1996) Distributional patterns of the American Peiratinae (Heteroptera: Reduviidae). *Zool. Medel. Leiden*, 70(1) 1-15.
- Morrone JJ** (2001) Biogeografía de América Latina y el Caribe. M&T – Manuales & Tesis SEA, vol. 3. Zaragoza, 148 pp.
- Muchugi A, C Kadu, R Kindt, H Kipruto, S Lemurt, K Olale, P Nyadoi, I Dawson, R Jamnadass** (2008) *Molecular markers for tropical trees, a practical guide to principles and procedures*. ICRAFT Technical Manual N°9. Dawson I & R Jamnadass eds. Nairobi: World Agroforestry Centre.
- Müller P** (1973) The Dispersal Centers of Terrestrial Vertebrates in the Neotropical Realm: A Study in the Evolution of the Neotropical Biota and Its Native Landscapes. The Hague: Dr. W. Junk.
- Murillo-A J, E Ruiz-P, LR Landrum, TF Stuessy, MH Barfuss** (2012) Phylogenetic relationships in *Myrceugenia* (Myrtaceae) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 62(2) 764-776.
- Myers N, RA Mittermeier, CG Mittermeier, AB Fonseca, J Kent** (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858.
- Nei M** (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70(12) Part I, 3321-3323.
- Nei M** (1975) *Molecular population genetics and evolution*. North-Holland Publishing Company.

- Nei M** (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89(3) 583-590.
- Nei M** (1987) “*Molecular Evolutionary Genetics*”. Columbia University Press, New York.
- Néri J** (2011) Análise dos padrões filogeográficos de *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Calophyllaceae). Tesis doctoral. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro Escola Nacional de Botânica Tropical Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu*. Jardim Botânico Do Rio de Janeiro. pp 86.
- Newton AC, TR Allnutt, ACM Gillies, AJ Lowe, RA Ennos** (1999) Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology and Evolution* 14, 140–145.
- Nybom H, IV Bartish** (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in plant ecology, evolution and systematic* 3(2) 93-114.
- Oakley L, D Prado, J Adámoli** (2005) Aspectos biogeográficos del Corredor fluvial Paraguay-Paraná. *Serie Misc. INSUGEO, 14*, 245-258.
- Oakley LJ, DE Prado** (2011) El dominio de los bosques secos estacionales neotropicales y la presencia del arco pleistocénico en la República del Paraguay. *Rojasiana* 10(1) 55-75.
- Olalde M, A Herrán, S Espinel, PG Goicoechea** (2002) White oaks phylogeography in the Iberian Peninsula. *Forest Ecology and Management* 156, 89–102.
- Oliveira-Filho AT, JA Ratter** (1995) A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. *Edin. J. Bot.* 52(2) 141-194.
- Olmstead RG, Palmer JD** (1994) Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *American journal of botany* 81(9) 1205-1224.
- Oostermeijer JGB, SH Luijten, JCM Den Nijs** (2003) Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. *Biological conservation* 113(3) 389-398.
- Orfeo O, JJ Neiff** (2008) Esteros del Iberá. En Sitios de interés geológico de la República Argentina. SEGEMAR. Argentina.
- Palmer JD** (1987) Chloroplast DNA and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *The American Naturalist* 130, S6-S29.
- Palmer JD** (1991) Plastid chromosomes: structure and evolution. En: Bogorad L, IK Vasil (eds.) The molecular biology of plastids. Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol.7A Academic Press, New York. pp. 5-53.
- Palmer JD, D Solis, P Soltis** (1992) Large size and complex structure of mitochondrial DNA in two nonflowering land plants. *Curr. Genet.* 21, 125-129.
- Pandey RN, RP Adams, LE Flournoy** (1996) Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter* 14(1) 17-22.
- Passos FC, G Gracioli** (2004) Observações da dieta de *Artibeus lituratus* (Olfers) (Chiroptera, Phyllostomidae) em duas áreas do su do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21 (3) 487-489.
- Patton JL** (2000) Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 244, 306 pp.
- Peakall R, M Ruibal, DB Lindenmayer** (2003) Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the Australian bush rat, *Rattus fuscipes*. *Evolution* 57, 1182-1195.

- Peakall R, P Smouse** (2006) GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.
- Peakall R, PE Smouse** (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Percuoco C** (2007) Obtención de marcadores RAPDs en una población de *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Clusiaceae) de San Ignacio – Mnes. Tesis de grado. Universidad Nacional de Misiones.
- Percuoco C, A Cardozo, M Rodriguez** (2009) Estudio comparativo de la distribución espacial y estructural de las poblaciones de la especie *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae), nuevo hallazgo para la flora argentina en selvas ribereñas. Informe Final – CEDIT. Jornada de Iniciación en la Investigación. Posadas-Misiones.
- Pereira Alvarenga LD, KC Porto** (2007) Patch size and isolation effects on epiphytic and epiphyllous bryophytes in the fragmented Brazilian Atlantic forest. *Biological conservation* 134(3) 415-427.
- Petit RJ, A Kremer, DB Wagner** (1993) Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. *Heredity* 71(6) 630-641.
- Petit RJ, E Pineau, B Demesure, R Bacilieri, A Ducousso, A Kremer** (1997) Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(18) 9996-10001.
- Petit RJ, UM Csaiklb, S Bordács, K Burg, E Coart, J Cottrell, [et al]** (2002) Chloroplast DNA variation in European white oaks phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* 156 5-26.
- Petit RJ, GG Vendramin** (2007) Plant phylogeography based on organelle genes: an introduction. En *Phylogeography of southern European refugia*. Springer Netherlands. pp. 23-97
- Pither R, J Shore, M Kellman** (2003) Genetic diversity of the tropical tree *Terminalia amazonia* - Combretaceae- in naturally fragmented populations. *Heredity* 91, 307–313.
- Pluzhnikov A, P Donnelly** (1996) Optimal sequencing strategies for surveying molecular genetic diversity. *Genetics* 144(3) 1247-1262.
- Pons O, RJ Petit** (1995) Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity. *Theoretical and Applied Genetics* 90(3-4) 462-470.
- Popolizio E** (2006) El Paraná, un río y su historia geomorfológica. *Revista Geográfica* 140, 79-90.
- Posadas P, JV Crisci, L Katinas** (2006) Historical biogeography: A review of its Basic concepts and critical issues. *Journal of Arid Environments* 66, 389-403.
- Powell W, M Morgante, R McDevitt, GG Vendramin, JA Rafalski** (1995a) Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(17), 7759-7763.
- Powell W, M Morgante, C Andre, JW Ncnicol, GC Machray, JJ Doyle, SV Tingey, JA Rafalski** (1995b) Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology* 5, 1023-1029.
- Powell W, GC Machray, J Provan** (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in plant science* 1 (7) 215-222.
- Provan J, N Soranzo, NJ Wilson, DB Goldstein, W Powell** (1999) A Low Mutation Rate For Chloroplast Microsatellites. *Genetics* 153, 943–947.

- Provan J, W Powell, PM Hollingsworth** (2001) Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 16, 142-147.
- Qosim WA, S Patarapuwadol, KN Watanabe** (2011) Development of SSR markers of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *International Research Journal of Biotechnology* 2(1), 001-008.
- Rakoczy-Trojanowska M, H Bolibok** (2004) Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cellular & Molecular Biology Letters* 9, 221-238.
- Ralser M, R Querfurth, HJ Warnatz, H Lehrach, ML Yaspo, S Krobitsch** (2006) An efficient and economic enhancer mix for PCR. *Biochemical and biophysical research communications* 347(3) 747-751.
- Ramos ACS, JP Lemos-Filh, RA Ribeiro, FR Santos, MB Lovato** (2007) Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of Quaternary climate changes in the Brazilian Cerrado. *Annals of botany* 100(6) 1219-1228.
- Rassmann K, C Schlötterer, D Tautz** (1991) Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction based DNA fingerprinting. *Electrophoresis* 12(2-3) 113-118.
- Redford KH, GA da Fonseca** (1986) The Role of Gallery Forests in the Zoogeography of the Cerrado's Non-volant Mammalian Fauna. *Biotropica*, 18(2) 126-135.
- Reis CAF, AM De Souza, E Galvão, GF Rodrigues, RM Guimarães, D de Carvalho** (2009) Diversidade e estrutura genética espacial de *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) em uma floresta paludosa. *Árvore* 33(2)265-275.
- Reitz R, RM Klein** (1978) Projeto madeira de Santa Catarina. *Sellowia* 30, 28-30.
- Richards MB, VA Macaulay, HJ Bandelt, BC Sykes** (1998) Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann. Hum. Genet.* 62, 241-260.
- Rodrigues RR** (2000) Florestas ciliares? Uma discussão nomenclatural das formações ciliares. En Ribeiro Rodrigues R, HF Leitão Filho (eds.) “*Matas Ciliares: conservação e recuperação*”. Editorial Universidad de São Paulo, p. 91-99.
- Rodríguez ME, A Cardozo, E Krauczuk, J Fontana, Y Iriart** (2009) *Calophyllum brasiliense* (CLUSIACEAE) nuevo registro para la flora de la Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 44 (3-4) 361-366.
- Rodríguez ME, AE Cardozo, JF Crivello, CB Percuoco, CF Argüelles, NL González, CB Sorol** (2011) Las selvas ribereñas en Misiones y Corrientes (Argentina). Propuesta de revisión de los modelos fitogeográficos de la Provincia Paranaense. XXXIII Jornadas Argentinas de Botánica. Posadas, Mnes. 7 - 10 de Oct. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 46 (Supl.) pág. 208.
- Rossi AAB, LO de Oliveira, BA Venturini, R dos Santos Silva** (2009) Genetic diversity and geographic differentiation of disjunct Atlantic and Amazonian populations of *Psychotria ipecacuanha* (Rubiaceae). *Genetica* 136(1) 57-67.
- Rozas J, R Rozas** (1995) DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating population genetics parameters from DNA sequence data. *Computer applications in the biosciences: CABIOS*, 11(6) 621-625.
- Ruhfel BR, V Bittrich, CP Bove, MH Gustafsson, CT Philbrick, R Rutishauser, CC Davis** (2011) Phylogeny of the clusioid clade (Malpighiales): evidence from the plastid and mitochondrial genomes. *American Journal of Botany* 98(2) 306-325.

- Sales E**, SG Nebauer, M Mus, J Segura (2001) Population genetic study in the Balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulariaceae) using RAPD markers. *American Journal of Botany* 88(10) 1750-1759.
- Salgueiro F**, J Neri, M Alves-Ferreira, F Scarano (2011) Phylogeographic patterns of *Calophyllum brasiliense* Camb. (Calophyllaceae) based on the *psbA-trnH* cpDNA locus. *BMC Proceedings* 5, (Suppl 7) P17.
- Sambrook J**, E Fritsch, T Maniatis (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanjurjo MD** (1994) El arary, un árbol en extinción en el Paraguay. *Revista Crítica* 9, 51-55.
- Santana QC**, MPA Coetzee, ET Steenkamp, OX Mlonyeni, GNA Hammond, MJ Wingfield, BD Wingfield (2009) Microsatellite discovery by deep sequencing of enriched genomic libraries. *BioTechniques* 46 (3) 217-223.
- Santos da Silva FAL** (2011) Caracterização da diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) em Santa Catarina e implicações para a coleta de sementes. Tesis de ingeniería agrónoma. Universidade Federal de Santa Catarina. Brazil.
- Schlag EM**, MS McIntosh (2012) RAPD-based assessment of genetic relationships among and within American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) populations and their implications for a future conservation strategy. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59(7) 1553-1568.
- Schlögl PS**, A Pereira de Souza, RO Nodari (2007) PCR-RFLP analysis of non-coding regions of cpDNA in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. *Genetics and Molecular Biology* 30 (2) 423-427.
- Schlotterer C**, D Tautz (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20(2) 211-215.s
- Schneider H** (2007) Metodos de análise filogenetica: um guia pratico. 3° ed. Riberão Preto: Holos Editora & Sociedade Brasileira de Genetica, 200 p.
- Schuster I** & CD Cruz (2008) Software GQMOL Versión 2008.6.1. Genética Quantitativa e Molecular. Universidade Federal de Viçosa. Laboratório de Bioinformática.
- Servant M**, J Maley, B Turcq, ML Absy, P Brenac, M Fourniere, MP Ledru (1993) Tropical forest changes during the late Quaternary in African and South American lowlands. *Global and Planetary Change* 7, 25-40.
- Shanjani P**, C Vettori, R Giannini, RA Khavari-nejad (2003) Intraspecific variation and geographic patterns of *Fagus orientalis* Lipsky chloroplast DNA. *Silvae Genetica* 53, 5–6.
- Shaw J**, EB Lickey, EE Schilling, RL Small (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94(3) 275-288.
- Shaw J**, EB Lickey, JT Beck, SB Farmer, W Liu, J Miller, KC Siripun, CT Winder, EE Schilling, RL Small (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* (1) 142-166.
- Shimada H**, M Sugiura (1991) Fine structural features of the chloroplast genome: comparison of the sequenced chloroplast genomes. *Nucleic Acids Research* 19, 983-995.
- Shinozaki K**, M Ohme, M Tanaka, T Wakasugi, N Hayashida, T Matsubayashi, M Zaita, J Chunwongse, J Obokata, K Yamaguchi-Shinozaki, C Ohto, K Torozawa, BY Meng, M Sugita, H Deno, T Kamogashira, K Yamada, J Kusuda, F Takaiwa, A Kato, N Tohdoh, H Shimada, M

- Sugiura (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO Journal* 5, 2043-2049.
- Silva** Freire M, H Torres Da Silva, A De Barros Freire (1995) Conservação de recursos genéticos de arroz e feijão. EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 54. Goiânia, Brasil.
- Smouse** PE, R Peakall (1999) Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity*, 82, 561-573
- Smouse** PE, R Peakall, E Gonzales (2008) A heterogeneity test for fine-scale genetic structure. *Molecular Ecology* 17, 3389-3400.
- Solé-Cava** AM (2004) Biodiversidade molecular e genética da conservação pp 171-192. En Russo Matioli S (ed.) “*Biología Molecular e Evolução*”. Ed. Holos.
- Sosa** V, E Ruiz-Sanchez, FC Rodriguez-Gomez (2009) Hidden phylogeographic complexity in the Sierra Madre Oriental: the case of the Mexican tulip poppy *Hunnemannia fumariifolia* (Papaveraceae). *Journal of Biogeography* 36(1) 18-27.
- Stange** C, D Prehn, P Arce-Johnson (1998) Isolation of *Pinus radiata* genomic DNA suitable for RAPD analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16: 1-8.
- Sugahara** K, Y Kaneko, S Ito, K Yamanaka, H Sakio, K Hoshizaki, W Suzuki, N Yamanaka, H Setoguchi (2011) Phylogeography of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata*) in the Japanese Archipelago based on chloroplast DNA haplotypes. *Journal of plant research* 124(1), 75-83.
- Sun** M, KC Wong (2001) Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. *American Journal of Botany* 88(12) 2180-2188.
- Sunnucks** P (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Tree* 15(5) 199-203.
- Tabarelli** M, W Mantovani, CA Peres (1999) Effects of hábitat fragmentation on plant guild structure in the montane Atlantic forest of southeastern Brazil. *Biological Conservation* 91, 119-127.
- Taberlet** P, L Gielly, G Pautou, J Bouvet (1991) Universal *primers* for amplifications of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17, 1105-1109.
- Taberlet** P, E Coissac, F Pompanon, L Gielly, C Miquel, A Valentini, T Vermet, G Corthier, C Brochmann, E. Willerslev (2007) Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acid. Res.* 35, e14.
- Tajima** F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura** K, D Peterson, N Peterson, G Stecher, M Nei, S Kumar (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28(10) 2731-2739.
- Tatto** N, CA Gazetta (eds.) (2009) Recuperando as matas ciliares do Vale do Ribeira. São Paulo: Instituto Socioambiental; Eldorado, SP: Instituto Vidágua.
- Thormann** CE, ME Ferreira, LEA Camargo, JG Tivang, TC Osborn (1994) Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theoretical and Applied Genetics* 88(8) 973-980.
- Timmermans** MJTN, J Ellers, J Marien, SC Verhoef, EB Ferwerda E. B, NM Van Straalen (2005) Genetic structure in *Orchesella cincta* (Collembola): strong subdivision of European populations inferred from mtDNA and AFLP markers. *Molecular Ecology* 14(7) 2017-2024.

- Torres ME, JM Iriondo, C Pérez** (2003) Genetic structure of an endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae): allozyme and RAPD analysis. *American Journal of Botany* 90(1) 85-92.
- Turner I, R Corlett** (1996) The conservation value of small, isolated fragments of lowland tropical rain forest. *Trends in Ecology and Evolution* 11(8) 330-333.
- Tuskan GA, LE Gunter, ZK Yang, T Yin, MM Sewell, P DiFazio** (2004) Characterization of microsatellites revealed by genomic sequencing of *Populus trichocarpa*. *Can J For Res* 34 85-93.
- Vázquez-Domínguez E** (2007) Filogeografía y Vertebrados, en Eguiarte LE, V Souza, X Aguirre (eds) (2007) *“Ecología Molecular”*. Instituto Nacional de Ecología. México. Cap. 14, 441-466.
- Vekeman X, OJ Hardy** (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology* 13, 921-935.
- Veloso HP, ALR Rangel Filho, JC Alves Lima** (1991) Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos ambientais 124 p.
- Vendramin GG, M Anzidei, A Madaghiele, G Bucci** (1998) Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster* Ait. as revealed by chloroplast microsatellites. *Theor Appl Genet.* 97, 456-463.
- Venkatachalam L, RV Sreedhar, N Bhagyalakshmi** (2008) The use of genetic markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and phylogenetic relationships among banana cultivars. *Molecular phylogenetics and evolution* 47(3) 974-985.
- Viana VM, AJA Tabanez, JLA Martinez** (1992) Restauração e manejo de fragmentos florestais. En: Congresso Nacional Sobre Essências Nativas. Anais. São Paulo: Instituto Florestal 4, 400- 406.
- Vincze TJ, J Posfai, RJ Roberts** (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acid Res.* 31, 3688-3691.
- Vitousek PM, HA Mooney, J Lubchenco, JM Melillo** (1997) Human domination of earth's ecosystems. *Science* 277, 494-499.
- Wallace AR** (1852) On the monkeys of the Amazon. *Proc. Zool. Soc. London* 20, 107-110.
- Wayne ML, KL Simonsen** (1998) Statistical tests of neutrality in the age of weak selection. *Trends in ecology & evolution* 13(6) 236-240.
- Weising K, R Gardner** (1999) A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42, 9-19.
- Welsh J, M McClelland** (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18 (24) 7213-7218.
- Wilke T, R Schultheiß, C Albrecht** (2009) As time goes by: a simple fool's guide to molecular clock approaches in invertebrates. *American Malacological Bulletin* 2, 25-45.
- Williams JGK, AR Kubelik, KJ Livak JA Rafalski, SV Tingey** (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Vol 18 (22) 6531-6535.
- Wink M** (2007) Systematics En: *Raptor: research and management techniques*, David M. Bird Ed. 2da . cap. 3: 57-72. *Hancock House Publishers*. ISBN 978-0-88839-639-6.
- Wolfe KH, WH Li, PM Sharp** (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 84, 9054-9058.

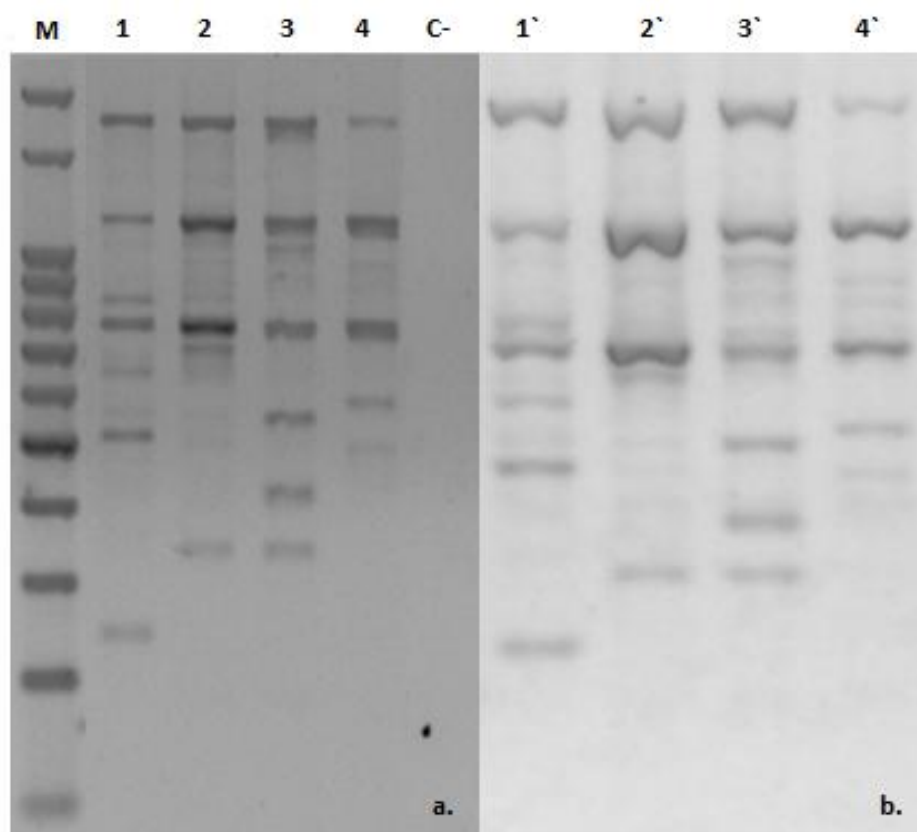
- Wolff K, M Morgan-Richards** (2010) The use of RAPD data in the analysis of population genetic. *Molecular Systematics and Plant Evolution* 51.
- Wright S** (1978) *Vol. 4: Variability within and among natural populations*. Chicago [etc.]: University of Chicago Press.
- Wurdack KJ, CC Davis** (2009) Malpighiales Phylogenetics: Gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the Angiosperm tree of life. *American Journal of Botany* 96(8) 1551-1570.
- Xena de Enrech N** (2000) Una década de aplicación del método RAPD: alcances y límites en el estudio de relaciones genéticas en plantas. *Acta Científica Venezolana* 51, 197-206.
- Zakaria R** (2003) Systematic studies on Guttiferae Juss. and Hypericaceae Juss. of peninsular Malaysia. Tesis de Maestría. Universiti Putra Malaysia.
- Zane L, L Bargelloni, T Patarnello** (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* 11:1-16.
- Zheng Z, L Schwartz, L Wagner, W Miller** (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput. Biol.* 7(1-2) 203-14.
- Zietkiewicz E, A Rafalski, D Labuda** (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176–183.
- Zimback L, ES Mori, PY Kageyama, RFA Veiga, JRS Mello Junior** (2004) Estrutura genética de populações de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) por marcadores RAPD. *Scientia forestalis* 65, 114-119.
- Zuchi, MA** (2002) Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2002. 130 p.
- Zúñiga-Vega C, P Ramírez** (2002) Los Geminivirus, patógenos de importancia mundial. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 64, 25-33.



VIII.Anexos

VIII. Anexos

Anexo I



Ensayo de reproducibilidad de marcadores RAPDs. En el ejemplo se muestran los resultados para *el primer B10*. En **a:** se identifican cuatro individuos de la población de San Ignacio amplificados en una reacción de PCR. En **b:** se muestran los cuatro mismos individuos bajo las mismas condiciones de amplificación en una segunda reacción. **M:** 100 pb *ladder* de Productos Bio-Lógicos. **C-:** control negativo.

Anexo II

Tabla I. Matriz binaria de doble entrada de los 31 individuos de San Ignacio para los *loci* de los *primers* A03 y A05.

Individuo	A03-1630	A03-1510	A03-1440	A03-1298	A03-1200	A03-1115	A03-1020	A03-0950	A03-0870	A03-0785	A03-0730	A03-0640	A03-0594	A03-0545	A03-0500	A03-0450	A03-0380	A03-0340	A03-0289	A03-0245	A05-1850	A05-1640	A05-1530	A05-1360	A05-1260	A05-1180	A05-1100	A05-1036	A05-0970	A05-0870	A05-0787	A05-0720	A05-0640	A05-0606	A05-0580	A05-0530	A05-0450	A05-0380	A05-0337	A05-0270	A05-0230	A05-0182		
A1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0		
A2	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	
A3	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	
A4	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	
A5	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	
A6	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	
A7	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	
A8	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	
A9	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	
A10	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	
B1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	
B2	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	
B3	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	
B4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	
B5	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	
B6	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1		
B7	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	
B8	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
B9	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	
B10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	
38	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	
51	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	
56	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	
67	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	
77	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	

Tabla I. continuación.

102	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	
151	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0
158	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
163	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
169	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0

Tabla II. Matriz binaria de doble entrada de los 31 individuos de San Ignacio para los *loci* de los *primers* B06 y B10. Se incluye en las dos columnas de la derecha las coordenadas geográficas en m.

Individuo	B06-1780	B06-1670	B06-1440	B06-1280	B06-1192	B06-0991	B06-0800	B06-0744	B06-0700	B06-0660	B06-0500	B06-0432	B06-0325	B10-1750	B10-1273	B10-1140	B10-1021	B10-0980	B10-0903	B10-0839	B10-0806	B10-0752	B10-0734	B10-0707	B10-0645	B10-0550	B10-0526	B10-0495	B10-0458	B10-0425	B10-0393	B10-0380	B10-0356	B10-0331	B10-0264	B10-0243	B10-0198	X (S-N)	Y (O-E)	
A1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	39	62.6	
A2	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	49	43.84	
A3	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	41.5	69.55	
A4	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	45.8	72	
A5	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	36.6	77.57	
A6	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27.52	88.85	
A7	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	47.9	101	
A8	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50.15	111.4	
A9	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	53.91	137.3	
A10	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	57.9	145.6	
B1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	47	77
B2	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	48.82	88.85
B3	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	56.8	93.27
B4	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	57.02	110
B5	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	56.15	128.85
B6	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	60.55	143.5
B7	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	80.67	150
B8	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	77	166.5	
B9	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	85	176	

B10	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	73.9	165.87			
14	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	64.75	16.73		
38	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.5	19.25		
51	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	43.1	36	
56	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	57	34
67	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30.9	13.8	
77	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	66.3	33.6	
102	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	61.3	13.9		
151	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	77.3	33.4
158	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	78.7	25.65
163	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	79.2	19.4
169	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	77.6	16.65

[illegible]

Tabla III. Continuación.

60a	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
95	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0
119	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1
122	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
129	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
140	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
162	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
166	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
170	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0
180	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1
192	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
212	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0
290	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1
304	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
308	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0
329	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
BM	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1

Tabla IV. Matriz binaria de doble entrada de los 30 individuos de Rincón Ombú para los *loci* del *primer* B10. Se incluye en las dos columnas de la derecha las coordenadas geográficas en m.

Individuo	B10-1750	B10-1273	B10-1140	B10-1021	B10-0980	B10-0903	B10-0839	B10-0806	B10-0752	B10-0734	B10-0707	B10-0645	B10-0550	B10-0526	B10-0495	B10-0458	B10-0425	B10-0393	B10-0380	B10-0356	B10-0331	B10-0264	B10-0243	B10-0198	X (S-N)	Y (O-E)
2g	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1.66	21.2
4a	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	8.77	19.72
6n	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	12.7	21.55
11	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16.3	25
17	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	19.85	16.85
41f	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	84.7	16.5
42g	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	89.16	23

Tabla IV. Continuación.

43	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	94.8	22.35
46d	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	99.69	24.3
47a	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	104.92	22.53
48a	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	103	16.3
49a	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0.2	12.3
51	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	4.4	12.2
60a	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	29.7	13
95	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	34.97	16.5
119	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	35.1	21.45
122	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	36.3	19.15
129	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	40.23	19.45
140	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	50.25	20
162	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	60.56	24.3
166	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	66.33	19.88
170	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	67.7	15.2
180	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	68.6	17.53
192	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	19.8	11.2
212	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	24.5	10.32
290	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	37.5	9.18
304	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	39.75	4
308	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34.5	1.5
329	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	44.9	12.7
BM	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	-	-

Anexo III

Tabla I. Matriz de distancia genética entre los 31 individuos de la población de San Ignacio.

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	14	38	51	56	67	77	102	151	158	163	169	
0																														A1	
3	0																													A2	
3	4	0																												A3	
6	7	9	0																											A4	
11	10	10	9	0																										A5	
9	8	8	9	10	0																									A6	
9	10	10	13	10	10	0																								A7	
9	8	8	13	6	12	10	0																							A8	
10	9	9	8	15	11	13	15	0																						A9	
8	7	7	8	3	9	9	7	12	0																					A10	
17	16	16	17	16	16	18	18	15	15	0																				B1	
25	24	26	23	26	22	26	24	21	25	16	0																			B2	
17	16	18	15	14	16	16	16	17	15	10	16	0																		B3	
12	13	13	14	13	17	17	13	12	12	17	19	15	0																	B4	
13	12	16	13	16	12	12	16	11	15	14	16	14	11	0																B5	
24	23	23	20	15	19	21	21	24	16	13	15	11	20	19	0															B6	
16	15	17	20	21	19	19	15	20	20	15	13	15	14	11	16	0														B7	
15	12	14	13	14	12	16	14	17	13	18	18	14	17	10	17	15	0													B8	
15	16	16	21	18	18	18	14	25	17	18	14	18	15	16	17	11	14	0												B9	
14	13	13	16	15	15	15	13	16	14	11	19	9	14	11	16	12	9	11	0											B10	
9	8	10	15	16	14	14	14	15	13	18	26	18	13	14	23	19	14	14	15	0										14	
11	14	10	13	16	12	14	14	15	13	22	26	22	15	18	27	21	16	18	17	12	0									38	
11	14	12	11	14	16	16	14	13	11	18	22	20	11	14	21	19	16	16	15	12	8	0								51	
12	15	13	16	19	17	19	19	18	16	19	23	19	10	17	22	16	19	17	18	13	11	9	0							56	
9	10	10	15	14	16	12	12	17	13	18	22	16	15	12	23	13	12	12	11	14	16	18	19	0						67	
16	15	13	14	15	19	23	17	16	14	11	19	15	14	21	16	20	19	17	14	15	17	13	14	21	0					77	
14	13	11	14	13	17	21	17	16	12	15	23	19	12	21	18	20	17	15	16	11	15	15	14	17	6	0				102	
18	17	19	18	17	19	19	19	18	16	11	15	11	16	13	14	16	17	17	14	19	27	21	20	19	14	14	0			151	
7	10	8	13	16	16	16	14	17	13	24	30	24	17	20	29	21	18	18	19	12	10	12	13	8	19	15	25	0		158	
15	16	16	17	16	18	16	12	21	15	20	20	20	15	16	21	17	14	12	17	12	10	8	11	16	15	17	23	14	0	163	
13	12	10	17	14	16	16	10	17	13	16	18	20	17	18	21	19	14	12	15	12	14	12	17	14	9	11	17	14	8	0	169

Tabla II. Matriz de distancia genética entre los 30 individuos de la población de Rincón Ombú.

2g	4a	6n	11	17	41f	42g	43	46d	47a	48a	49a	51	60a	95	119	122	129	140	162	166	170	180	192	212	290	304	308	329	BM	
0																													2g	
13	0																												4a	
19	14	0																											6n	
20	21	25	0																										11	
14	11	15	20	0																									17	
18	15	19	8	14	0																								41f	
19	18	24	9	17	9	0																							42g	
15	14	12	19	15	15	20	0																						43	
13.21117.21117.21120.21112.21115.21115.21111.211	0																												46d	
18	23	19	20	20	20	19	17	16.211	0																				47a	
17	14	16	11	15	11	14	18	20.211	17	0																			48a	
18	19	23	6	16	8	3	17	16.211	18	13	0																		49a	
17	20	26	11	21	11	8	22	16.211	19	14	11	0																	51	
16	11	15	26	14	20	25	15	17.211	26	17	22	25	0																60a	
20	23	25	14	20	12	11	27	21.211	22	11	12	11	22	0															95	
13	14	22	21	15	17	16	14	13.211	29	18	17	14	13	19	0														119	
12	13	15	24	16	18	21	11	16.211	22	19	22	19	14	22	9	0													122	
19	16	16	27	15	23	24	12	15.211	15	20	25	26	17	25	20	17	0												129	
16	19	21	12	16	10	7	21	16.211	16	7	8	9	20	6	17	22	21	0											140	
19	18	20	23	21	19	20	16	17.211	9	22	21	22	25	27	26	19	16	21	0										162	
22	19	13	24	16	16	21	9	15.211	22	21	22	23	18	26	17	16	11	22	21	0									166	
15	14	16	25	17	19	26	10	15.211	19	20	25	26	19	27	18	15	10	23	14	13	0								170	
17	22	30	11	19	13	10	24	18.211	21	18	9	14	23	11	20	23	28	11	24	27	24	0							180	
17	14	20	13	19	11	8	18	16.211	21	12	11	8	23	13	14	19	24	11	20	21	20	16	0						192	
16.21118.21122.21115.21121.21112.21116.21114.21117.21115.21115.21115.21120.21118.21116.21117.21122.21115.21116.21118.21114.21113.21115.211	0																												212	
18	19	23	14	20	12	13	21	17.211	20	15	12	15	18	14	15	20	27	14	21	24	23	11	13	10.211	0				290	
14.21112.21114.21123.21117.21118.21118.21114.21115.21119.21119.21119.21121.21116.21120.21118.21115.21116.21119.21116.21118.21112.21121.21115.21118.21118.211	0																												304	
14	19	15	20	18	18	21	19	17.211	22	21	20	25	24	22	23	20	21	22	19	20	17	21	23	18.211	16	12.211	0		308	
8	13	17	24	12	16	21	19	13.211	24	19	20	21	14	22	15	16	21	20	21	22	17	23	19	18.211	16	12.211	12	0	329	
15	18	18	17	15	15	16	16	15.211	19	14	17	16	23	21	14	17	22	17	18	19	18	20	14	14.211	13	20.211	15	15	0	BM

Tabla III. Matriz de distancia geográfica entre los 31 individuos de la población de San Ignacio.

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	B1	B2	B3	B4
A1														
A2	21.259													
A3	7.386	26.782												
A4	11.602	28.341	4.949											
A5	15.161	35.937	9.398	10.755										
A6	28.651	49.873	23.831	24.861	14.480									
A7	39.418	57.171	32.095	29.076	26.013	23.727								
A8	50.058	67.570	42.735	39.639	36.443	31.947	10.641							
A9	76.173	93.589	68.877	65.802	62.188	55.171	36.794	26.172						
A10	85.125	102.148	77.798	74.588	71.287	64.370	45.707	35.067	9.209					
B1	16.473	33.220	9.260	5.142	10.416	22.801	24.017	34.544	60.695	69.461				
B2	28.027	45.010	20.642	17.118	16.630	21.300	12.185	22.589	48.717	57.472	11.989			
B3	35.461	50.042	28.226	23.946	25.584	29.612	11.788	19.311	44.125	52.342	18.993	9.122		
B4	50.710	66.644	43.325	39.622	38.323	36.298	12.813	7.011	27.477	35.611	34.488	22.684	16.731	0.000

151	102	77	67	56	51	38	14	B10	B9	B8	B7	B6	B5	
48.161	53.563	39.828	49.468	33.793	26.914	43.698	52.603	109.008	122.375	110.631	96.825	83.721	68.434	A1
30.164	32.368	20.103	35.072	12.682	9.812	29.067	31.353	124.544	136.975	125.815	110.783	100.327	85.310	A2
50.877	59.067	43.674	56.749	38.782	33.588	50.932	57.711	101.623	114.995	103.245	89.479	76.364	61.083	A3
49.822	60.132	43.529	60.077	39.616	36.101	54.165	58.428	97.986	111.142	99.517	85.440	73.006	57.784	A4
60.062	68.293	53.061	64.024	48.109	42.075	58.402	67.037	95.855	109.686	97.677	84.784	70.145	54.880	A5
74.517	82.211	67.501	75.126	62.270	55.099	69.856	81.163	89.907	104.399	92.075	81.020	63.856	49.190	A6
73.716	88.125	69.866	88.842	67.615	65.177	83.009	85.938	69.886	83.674	71.673	58.948	44.343	29.046	A7
82.590	98.135	79.459	99.480	77.703	75.729	93.642	95.789	59.423	73.401	61.294	49.208	33.743	18.453	A8
106.500	123.621	104.438	125.625	103.346	101.875	119.801	121.056	34.869	49.641	37.226	29.621	9.085	8.742	A9
113.865	131.744	112.315	134.537	111.604	110.595	128.684	129.052	25.824	40.726	28.313	23.191	3.381	16.841	A10
53.095	64.700	47.498	65.218	44.147	41.185	59.307	62.829	92.852	106.042	94.394	80.391	67.866	52.651	B1
62.336	75.982	57.949	77.160	55.457	53.159	71.266	73.858	81.001	94.362	82.605	68.947	55.895	40.666	B2
63.282	79.497	60.422	83.584	59.270	58.886	77.601	76.952	74.587	87.404	75.965	61.547	50.370	35.586	B3
79.239	96.195	76.962	99.683	76.000	75.298	93.748	93.590	58.364	71.686	59.929	46.469	33.685	18.870	B4
97.765	115.065	95.789	117.788	94.854	93.763	111.916	112.449	41.055	55.276	43.038	32.381	15.296	0.000	B5
111.367	129.602	110.050	133.046	109.558	108.907	127.160	126.840	26.051	40.670	28.277	21.144	0.000		B6
116.649	137.471	117.284	145.009	118.390	120.031	138.998	134.218	17.254	26.358	16.903	0.000			B7
133.100	153.406	133.330	159.507	134.001	134.831	153.541	150.270	3.163	12.420	0.000				B8
142.808	163.823	143.623	170.984	144.734	146.136	164.993	160.552	15.028	0.000					B9
132.514	152.491	132.488	158.033	132.949	133.472	152.084	149.420	0.000						B10
20.866	4.462	16.941	33.977	18.929	28.984	31.351	0.000							14
46.029	28.310	35.802	6.038	27.745	19.306	0.000								38
34.299	28.630	23.324	25.331	14.043	0.000									51
20.309	20.555	9.309	33.004	0.000										56
50.370	30.400	40.561	0.000											67
11.002	20.325	0.000												77
25.224	0.000													102
0.000														151
														158
														163
														169

	169	163	158	
A1	60.011	59.011	54.235	A1
A2	39.462	38.850	34.828	A2
A3	64.044	62.740	57.542	A3
A4	63.835	62.308	56.840	A4
A5	73.432	72.101	66.844	A5
A6	87.868	86.569	81.324	A6
A7	89.426	87.397	81.402	A7
A8	98.646	96.477	90.378	A8
A9	122.954	120.582	114.369	A9
A10	130.446	127.985	121.740	A10
B1	67.664	65.989	60.347	B1
B2	77.725	75.804	69.907	B2
B3	79.393	77.192	71.078	B3
B4	95.592	93.275	87.092	B4
B5	114.232	111.851	105.635	B5
B6	127.991	125.494	119.239	B6
B7	133.385	130.608	124.366	B7
B8	149.851	147.116	140.860	B8
B9	159.522	156.707	150.482	B9
B10	149.266	146.566	140.302	B10
14	12.850	14.695	16.558	14
38	44.177	45.700	45.651	38
51	39.556	39.734	37.074	51
56	26.933	26.571	23.251	56
67	46.787	48.624	49.247	67
77	20.371	19.185	14.730	77
102	16.530	18.726	20.996	102
151	16.753	14.128	7.875	151
158	9.067	6.270	0.000	158
163	3.182	0.000		163
169	0.000			169

Tabla IV. Matriz de distancia geográfica entre los 30 individuos de la población de Rincón Ombú.

	2g	4a	6n	11	17	41f	42g	43	46d
2g									
4a									
6n									
11									
17									
41f									
42g									
43									
46d									
47a									
48a									
49a									
51									
60a									
95									
119									
122									
129									
140									
162									
166									
170									
180									
192									
212									
290									
304									
308									
329									
BM									

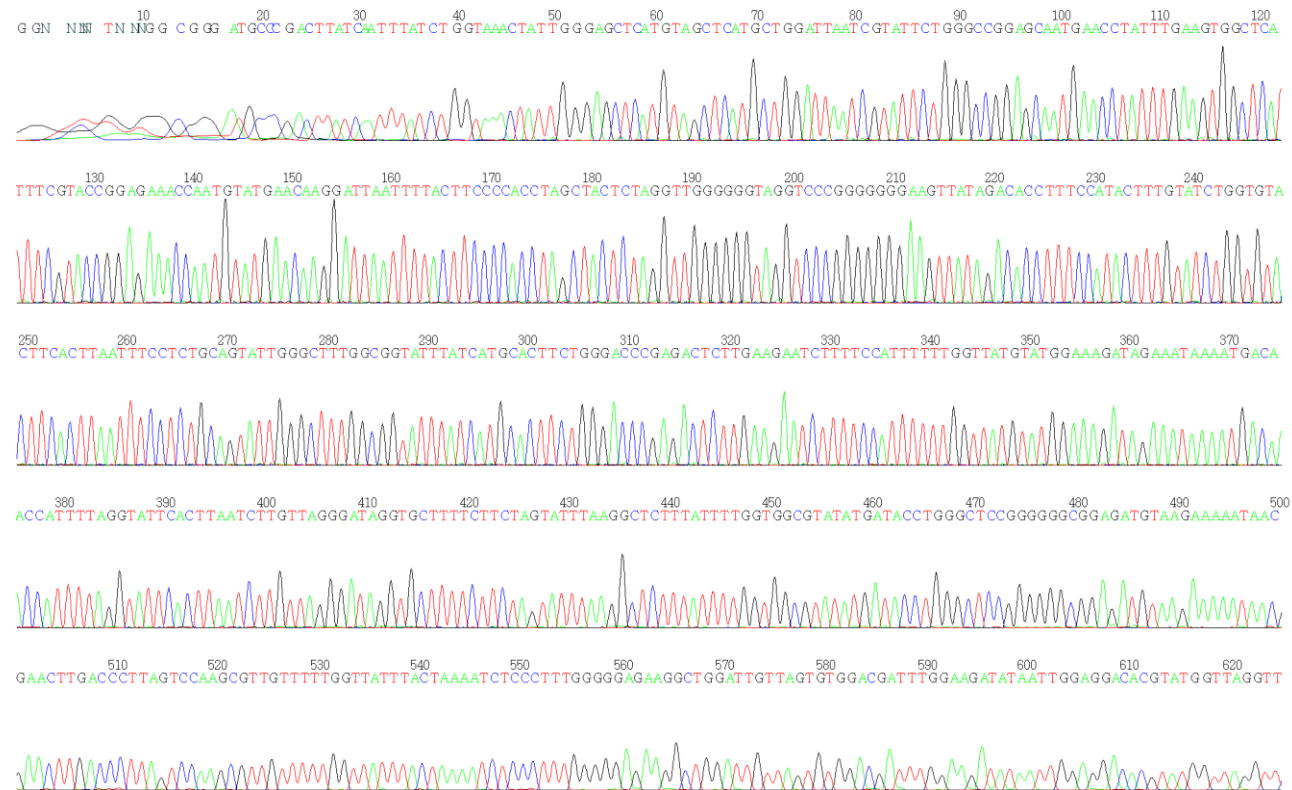
180	170	166	162	140	129	122	119	95	60a	51	49a	48a	47a	2g
67.041	66.312	64.683	58.982	48.605	38.610	34.701	33.441	33.640	29.214	9.408	9.019	101.458	103.274	4a
59.870	59.103	57.560	51.992	41.481	31.461	27.536	26.387	26.397	21.982	8.698	11.336	94.292	96.196	6n
56.044	55.365	53.656	47.939	37.582	27.610	23.722	22.400	22.835	19.029	12.502	15.550	90.452	92.230	11
52.831	52.326	50.291	44.266	34.316	24.565	20.838	19.132	20.514	17.988	17.477	20.506	87.135	88.659	17
48.755	47.878	46.579	41.386	30.563	20.545	16.610	15.929	15.124	10.576	16.135	20.170	83.152	85.264	41f
16.133	17.050	18.678	25.369	34.627	44.568	48.472	49.846	49.730	55.111	80.415	84.604	18.301	21.105	42g
21.275	22.834	23.042	28.630	39.025	49.059	53.000	54.082	54.578	60.295	85.445	89.601	15.376	15.772	43
26.640	28.027	28.577	34.295	44.612	54.647	58.587	59.707	60.115	65.768	90.968	95.132	10.190	10.127	46d
31.819	33.259	33.652	39.130	49.627	59.657	63.599	64.653	65.188	70.896	96.055	100.211	8.658	5.526	47a
36.668	37.940	38.686	44.400	54.734	64.768	68.708	69.833	70.214	75.826	101.054	105.223	6.521	0.000	48a
34.422	35.317	36.844	43.187	52.880	62.849	66.761	68.095	68.030	73.374	98.685	102.878	0.000		49a
68.600	67.562	66.563	61.541	50.639	40.664	36.744	36.080	35.023	29.508	4.201	0.000			51
64.421	63.371	62.404	57.449	46.509	36.556	32.648	32.063	30.871	25.313	0.000				60a
39.163	38.064	37.271	32.864	21.710	12.348	9.021	10.028	6.326	0.000					95
33.646	32.756	31.542	26.752	15.676	6.031	2.965	4.952	0.000						119
33.729	33.194	31.269	25.619	15.219	5.506	2.594	0.000							122
32.341	31.647	30.039	24.801	13.976	3.941	0.000								129
28.435	27.797	26.104	20.901	10.035	0.000									140
18.515	18.098	16.080	11.171	0.000										162
10.511	11.567	7.268	0.000											166
3.267	4.876	0.000												170
2.498	0.000													180
0.000														192
														212
														290
														304
														308
														329
														BM

BM	329	308	304	290	212	192	
32.807	44.068	38.296	41.793	37.802	25.299	20.714	2g
35.150	36.806	31.528	34.740	30.602	18.325	13.937	4a
34.495	33.394	29.618	32.244	27.714	16.290	12.551	6n
32.789	31.133	29.724	31.479	26.452	16.815	14.237	11
41.659	25.391	21.219	23.688	19.245	8.016	5.650	17
91.717	39.981	52.393	46.656	47.764	60.516	65.116	41f
93.452	45.443	58.736	52.937	53.477	65.892	70.357	42g
98.996	50.825	63.803	58.028	58.794	71.322	75.824	43
103.062	56.005	69.062	63.284	64.002	76.479	80.957	46d
108.585	60.825	73.498	67.758	68.734	81.347	85.876	47a
108.744	58.211	70.081	64.435	65.886	78.727	83.356	48a
41.708	44.702	35.960	40.412	37.430	24.381	19.631	49a
41.938	40.503	31.945	36.289	33.237	20.188	15.432	51
50.047	15.203	12.462	13.491	8.685	5.850	10.062	60a
50.599	10.632	15.007	13.383	7.745	12.158	16.069	95
47.141	13.138	19.959	18.059	12.503	15.370	18.416	119
49.605	10.750	17.742	15.538	10.042	14.738	18.315	122
52.275	8.208	18.842	15.457	10.627	18.188	22.033	129
59.846	9.051	24.296	19.138	16.722	27.509	31.696	140
66.554	19.488	34.626	29.071	27.575	38.675	42.813	162
73.703	22.601	36.756	30.962	30.752	42.909	47.333	166
77.164	22.937	35.916	30.111	30.794	43.475	48.067	170
76.810	24.187	37.680	31.865	32.201	44.686	49.209	180
46.747	25.145	17.612	21.209	17.815	4.782	0.000	192
49.600	20.538	13.334	16.508	13.050	0.000		212
57.802	8.195	8.245	5.648	0.000			290
63.258	10.110	5.815	0.000				304
62.278	15.284	0.000					308
60.274	0.000						329
0.000							BM

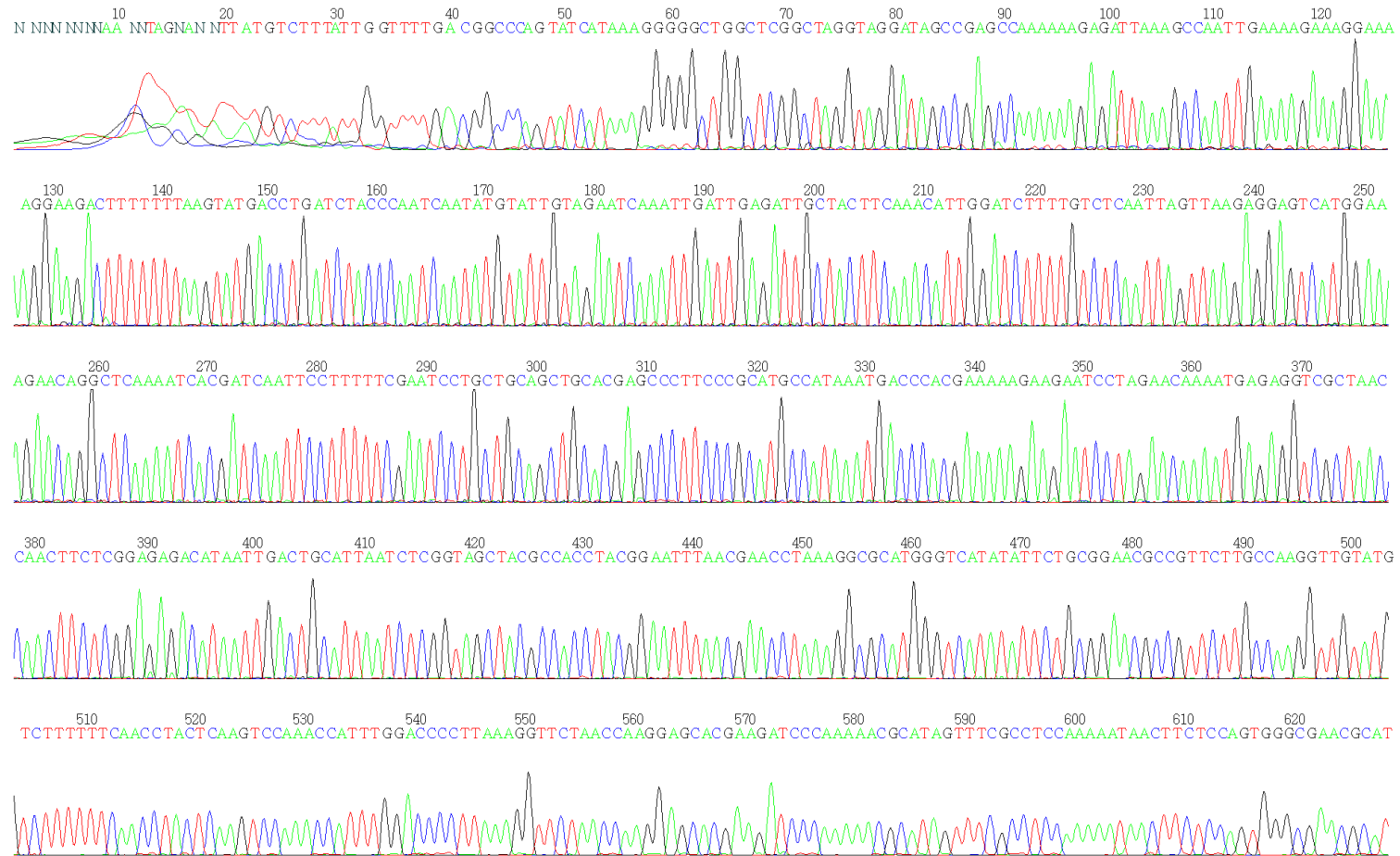
Anexo IV

Secuencias de las distintas regiones: se muestran ejemplos de los electroferogramas de las ocho regiones cloroplásticas obtenidas en el presente trabajo. Las secuencias restantes se encuentran a disposición.

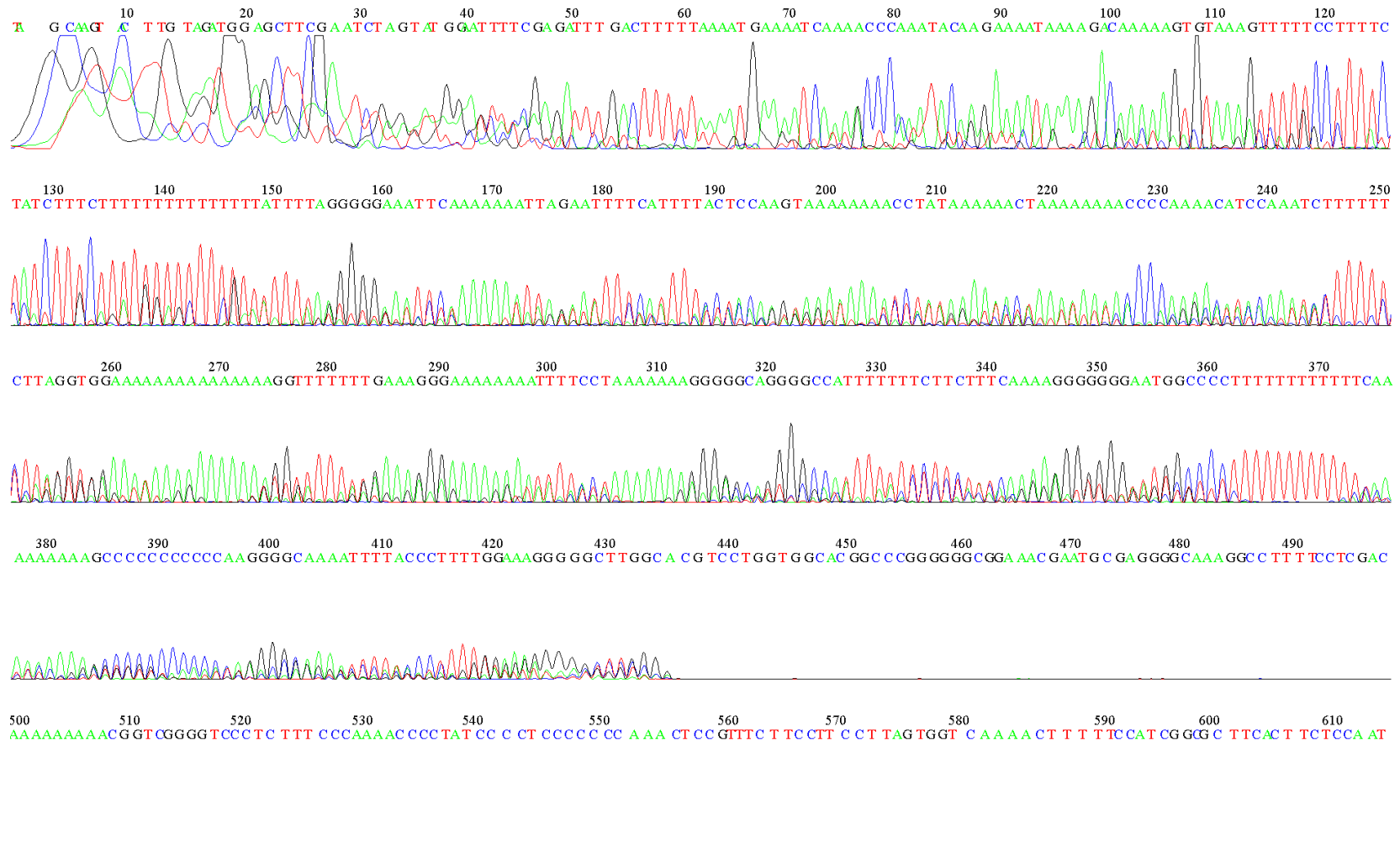
Region *psbC-trnS*. Población RO. Secuencia sentido.



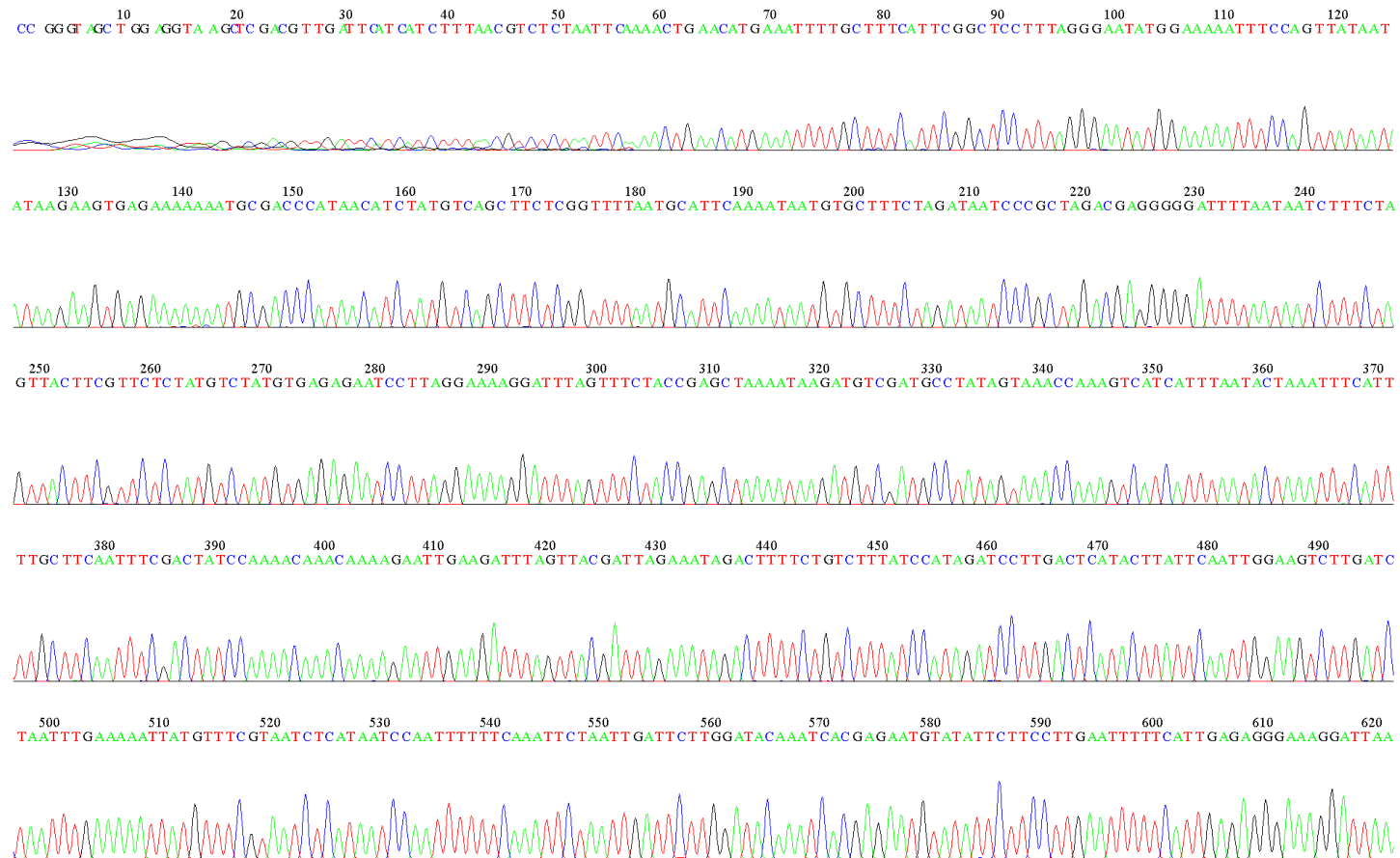
Región *psbC-trnS*. Población SI. Secuencia antisentido.



Región *trnH-psbA*. Población PV. Secuencia sentido.



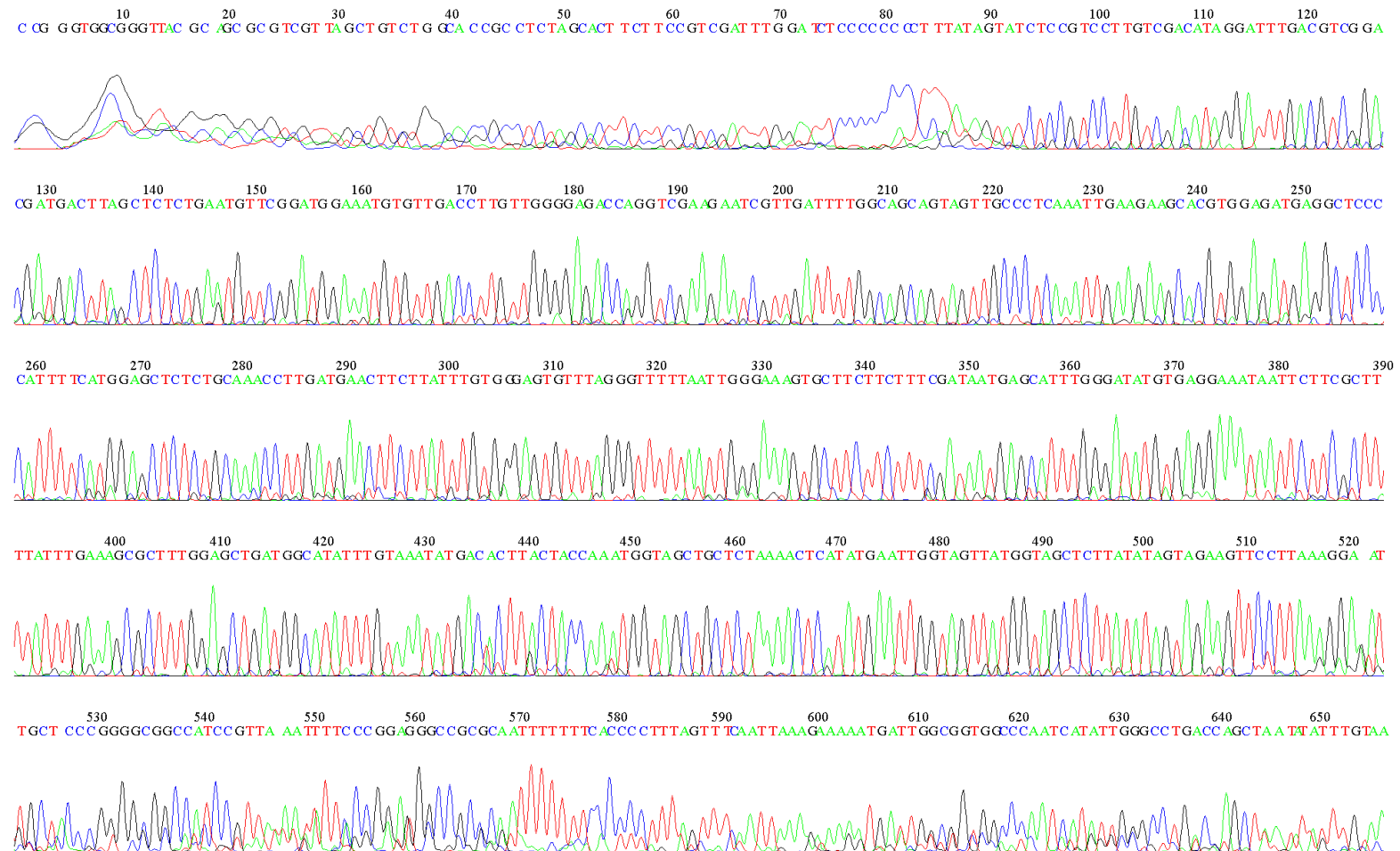
Región *trnG-trnS*. Población IY. Secuencia sentido.



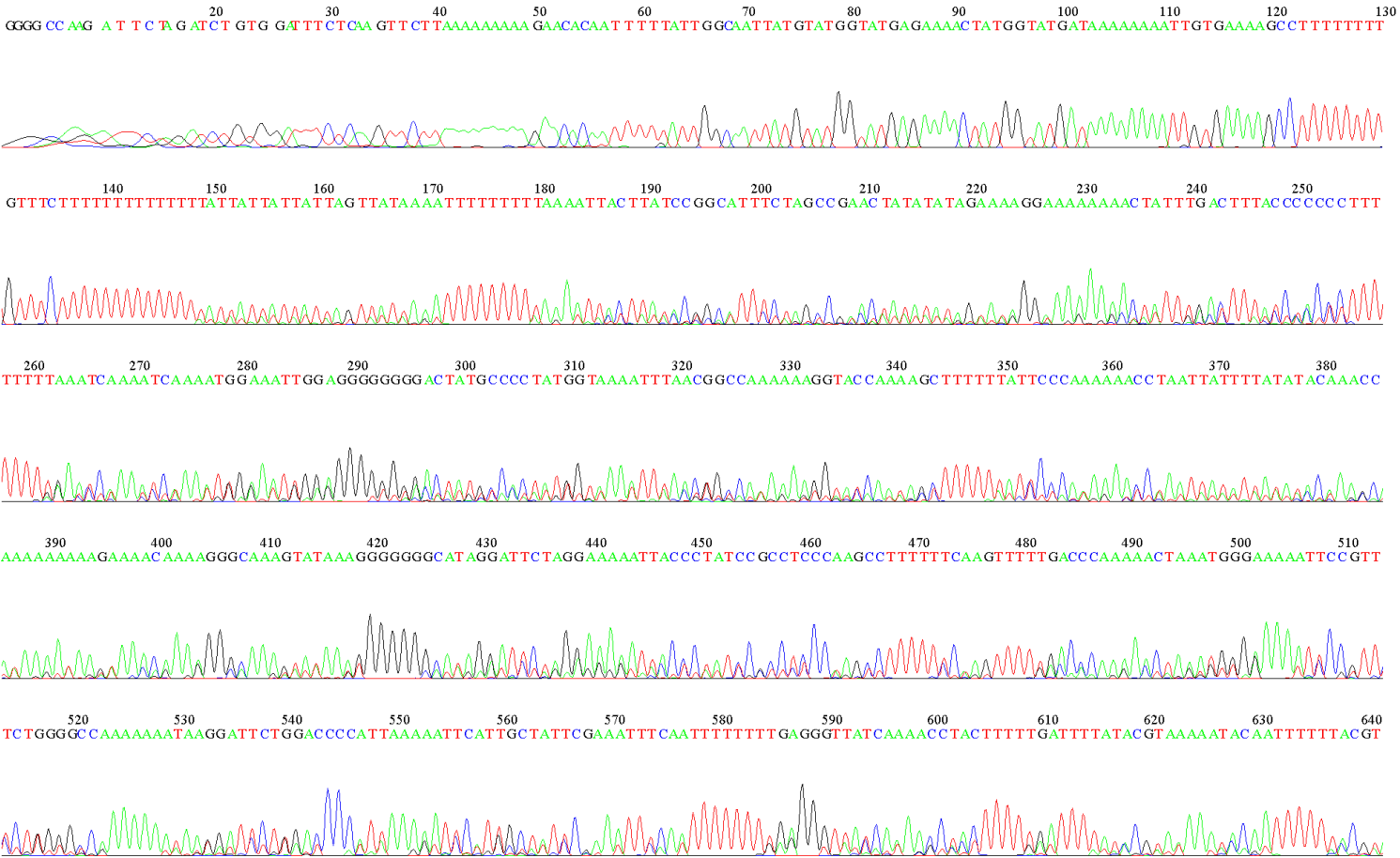
Región *trnS-trnG*. Población IY. Secuencia antisentido.



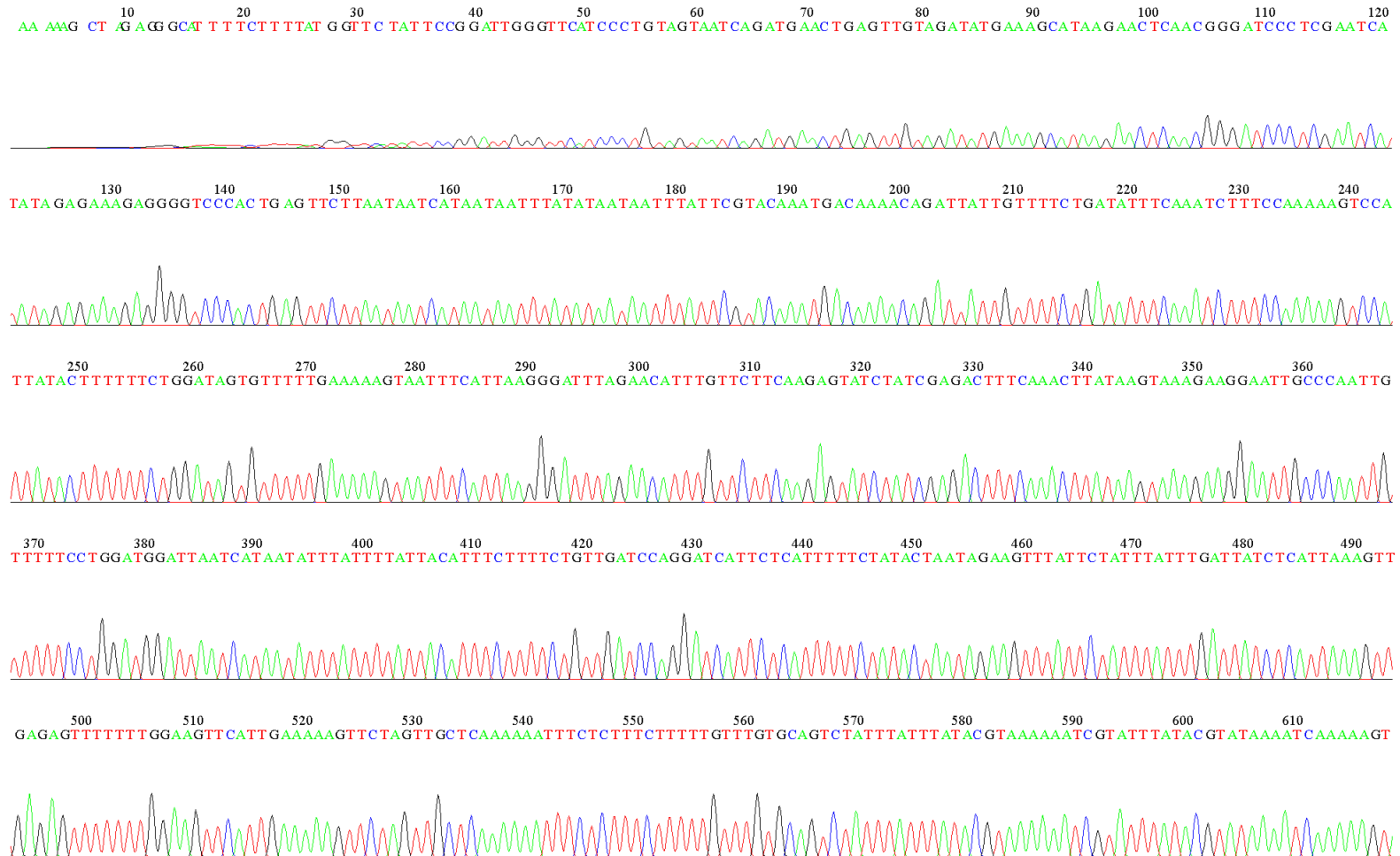
Región *rpl32-trnL*. Población AY. Secuencia antisentido.



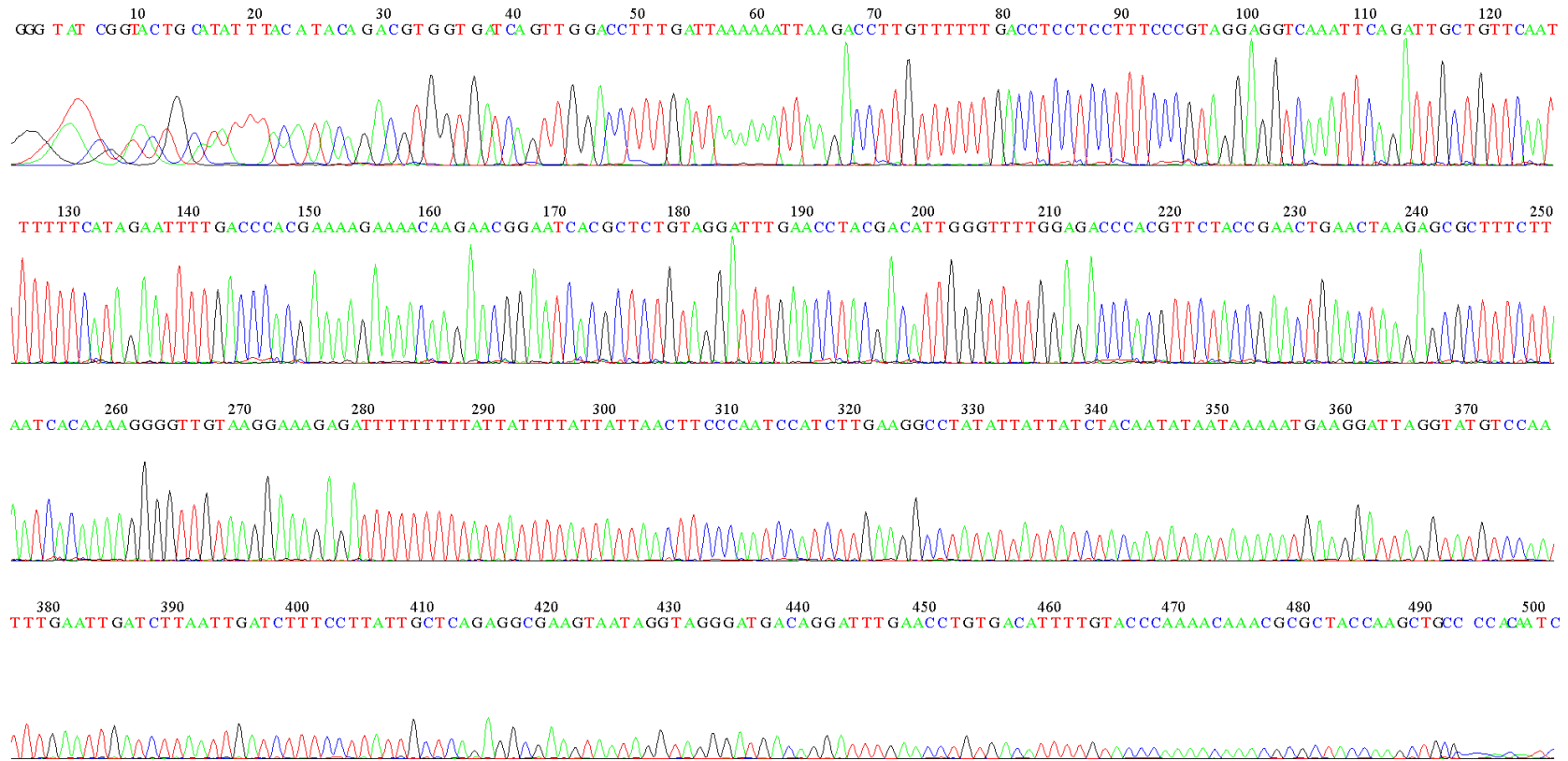
Región *psbJ-petA*. Población MX. Secuencia sentido.



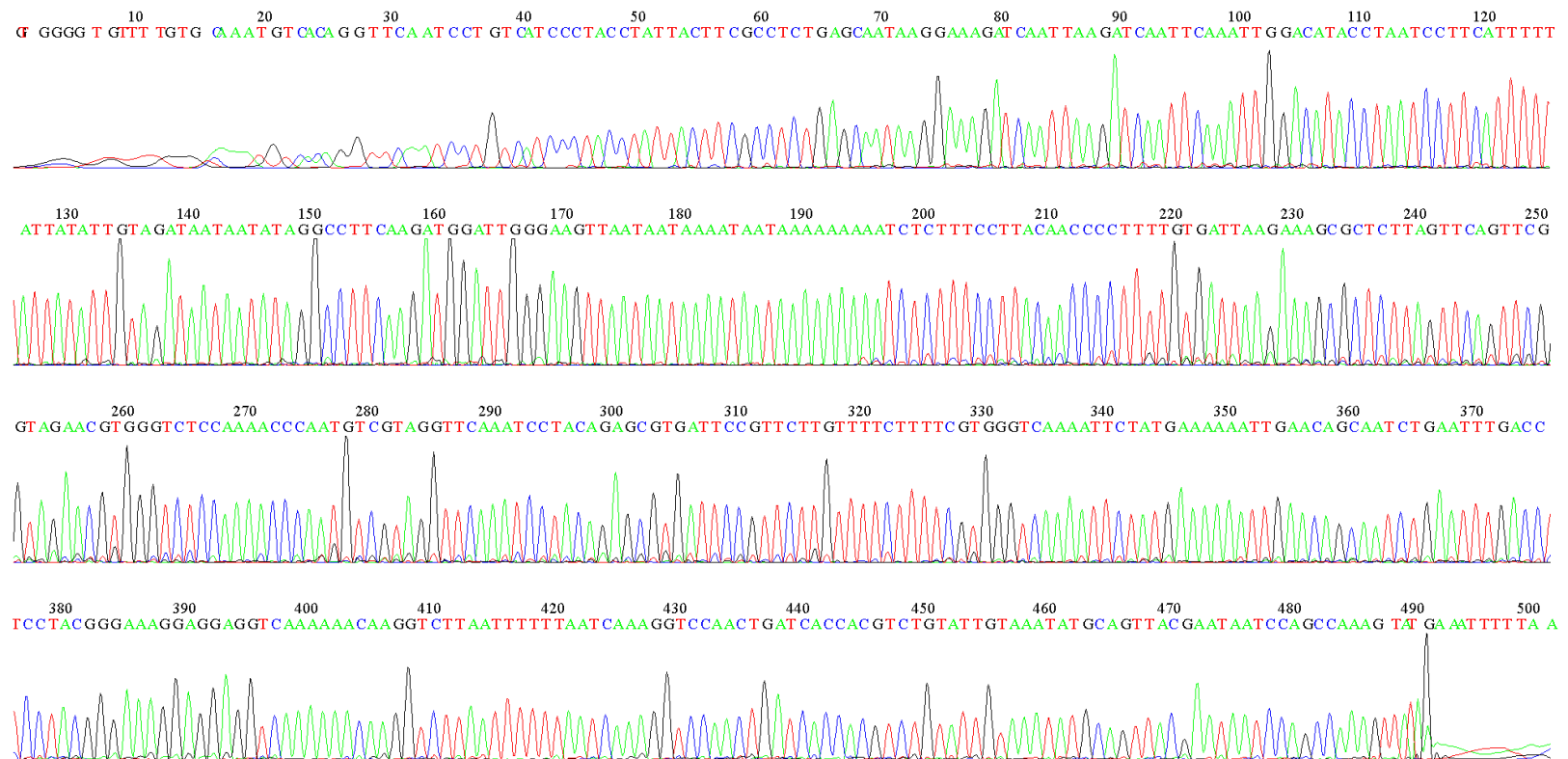
Región *psbJ-petA*. Población MX. Secuencia antisentido.



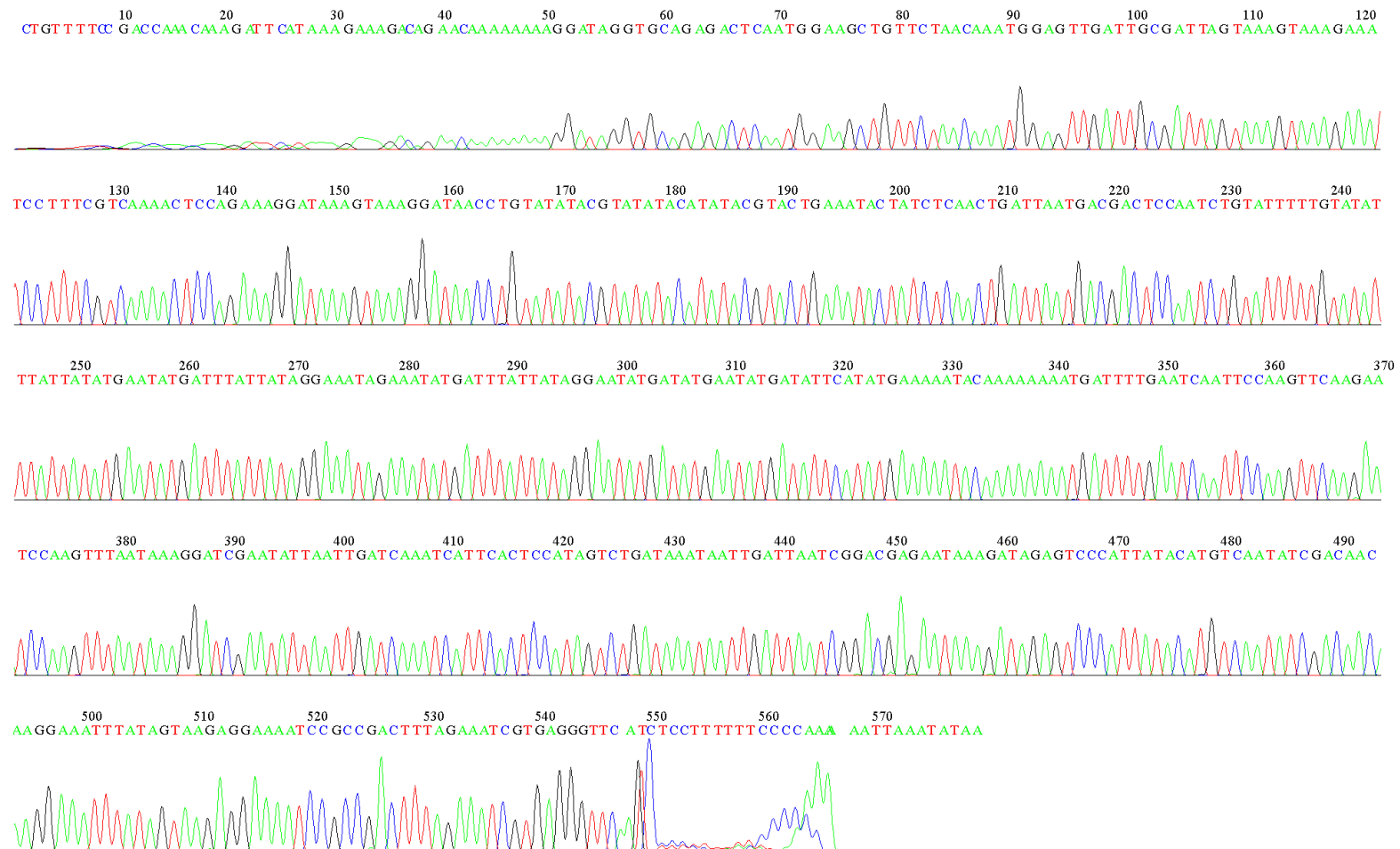
Región *petG-trnP*. Población PV. Secuencia sentido.



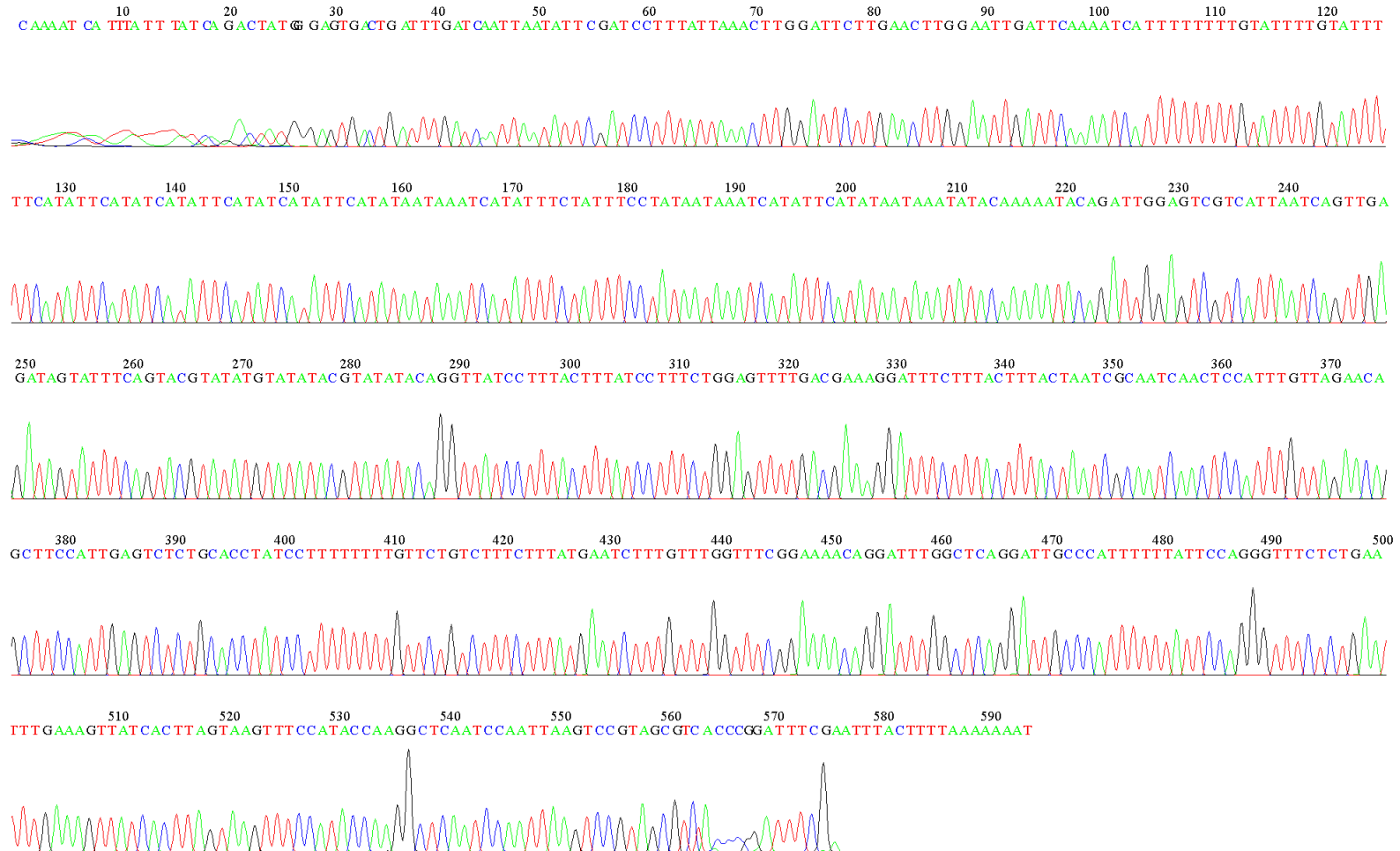
Región *petG-trnP*. Población RO. Secuencia antisentido.



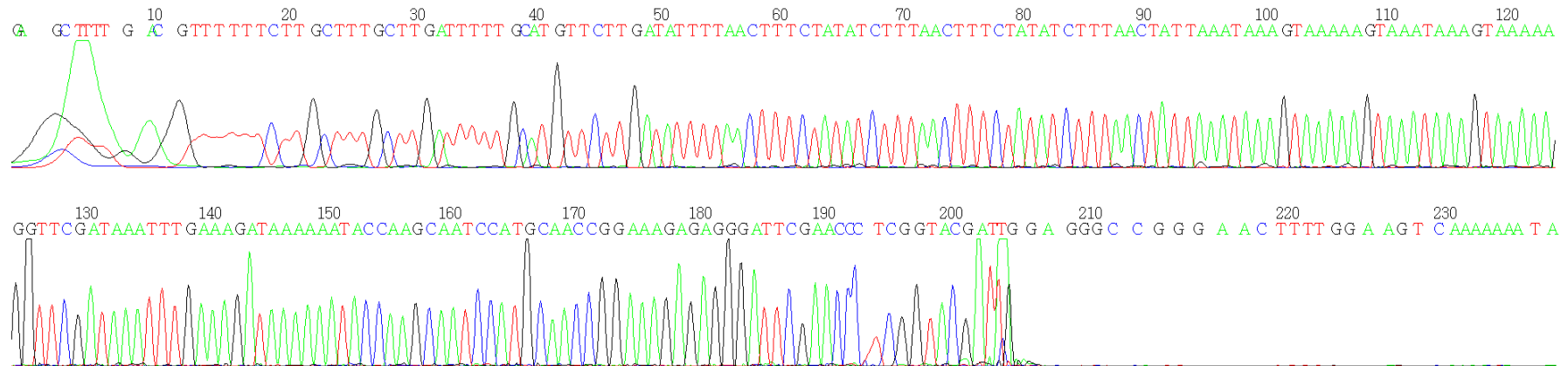
Región intrón del gen *trnL*. Población AY. Secuencia sentido.



Región intrón del gen *trnL*. Población MX. Secuencia antisentido.



Región ccmp2. Población RO. Secuencia sentido.



Región ccmp2. Población SI. Región antisentido.

